

Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Möller

Alternatives Fehlspleißen von Tau Exon 10, Htra2- β und Clk2 in *post mortem* Hirngewebe von Alzheimer-Patienten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Daniela C. Glatz

aus
Nürnberg

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-J. Möller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. C. Haass
Prof. Dr. J. Herms
Priv. Doz. Dr. A. Flügel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Dan Rujescu

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2005

*Meinem Ömchen
sowie
Eltern und Geschwistern
für ihre
Unterstützung*

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	7
2	EINLEITUNG	9
2.1	Einteilung und Epidemiologie verschiedener Demenzformen	9
2.2	Symptomatik und Verlauf der Alzheimer-Erkrankung	9
2.3	Neuropathologie.....	11
2.3.1	Amyloid-Plaques	11
2.3.2	Neurofibrilläre Bündel	12
2.4	Das Tau-Protein.....	17
2.4.1	Funktion und Struktur des Tau-Proteins	18
2.4.2	Genorganisation.....	21
2.4.3	Spleißen.....	22
2.5	SR-Proteine und SR-ähnliche Proteine.....	26
2.5.1	Tra2 und Htra2- β	27
2.6	Clk-Kinasen	29
2.6.1	CDC-ähnliche Kinase 2 (Clk2).....	30
2.7	Zielsetzung	31
3	MATERIALIEN UND METHODEN.....	32
3.1	Materialien.....	32
3.1.1	Geräte.....	32
3.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	33
3.1.3	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	35
3.1.4	Antikörper	38
3.1.5	Oligonukleotide	39
3.1.6	Hirngewebe.....	40

3.2	Methoden	43
3.2.1	Präparation des Gewebes	43
3.2.2	RNA-Extraktion.....	43
3.2.3	Photometrische Reinheits- und Ausbeutebestimmung der RNA	44
3.2.4	Primerdesign.....	45
3.2.5	Reverse Transkription	46
3.2.6	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
3.2.7	Gelelektrophorese	57
3.3	Western Blot	58
3.3.1	Gewinnung des Lysats und Probenbereitung	59
3.3.2	SDS-Page und Blot	59
3.3.3	Blocking und Antikörper.....	59
3.3.4	Detektion	60
3.4	Auswertung.....	60
3.4.1	RT-PCR.....	60
3.4.2	Western Blots	60
4	ERGEBNISSE	62
4.1	RT-PCR Analyse	62
4.1.1	Relative mRNA-Expression von tau +Exon 10/-Exon 10	63
4.1.2	Relative mRNA-Expression von htra2-β1/ htra2-β3	70
4.1.3	Relative mRNA-Expression von clk2 +Exon4/+Exon4	75
4.2	Western Blots.....	80
4.2.1	Expression der hTRA2-beta Isoformen auf Proteinebene	80
5	DISKUSSION	84
5.1	Regionenspezifische Expression der tau-Isoformen in Alzheimer-Gehirnen	86
5.1.1	Der präfrontale und temporale Kortex ergaben auf mRNA-Ebene ein verändertes Verhältnis der Tau-Isoformen in Alzheimer-Gehirnen.....	86
5.1.2	Okzipitalkortex und supplementärer Motokortex zeigten auf mRNA-Ebene keinen Unterschied.....	89

5.2	Expression von Htra2-β in Alzheimer-Gehirnen.....	89
5.2.1	mRNA-Expression der htra2- β 1 bzw. htra2- β 3 Isoformen.....	90
5.2.2	Proteinexpression der hTRA2- β 1 bzw. hTRA2- β 3 Isoformen	90
5.3	Das Expressionsmuster der Isoformen der Kinase clk2 ist verändert in Alzheimer-Gehirnen	91
5.4	Zusammenhang zwischen dem alternativen Spleißen von Tau, dem SR-ähnlichen Protein Htra2-β und der Kinase Clk2.....	92
5.5	Ansätze für eine kausale Therapie der Alzheimer-Erkrankung.....	95
5.5.1	Sekretasemodulatoren und Immunisierung.....	95
5.5.2	Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren	95
5.5.3	SR-Protein Modulatoren	96
5.5.4	Gentherapeutische Ansätze	97
6	ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE.....	98
7	LITERATURVERZEICHNIS	101
8	PUBLIKATIONEN	114
9	DANKSAGUNGEN.....	115
10	LEBENS LAUF	117

1 Zusammenfassung

Neuere Studien zeigen, dass Fehlregulationen alternativer Spleißprozesse erheblichen Einfluss auf die Entstehung von Krankheiten besitzen können. Exon 10 des Tau-Gens wird alternativ gespleißt und je nachdem, ob das Exon ein- oder ausgeschlossen wird, werden Isoformen mit drei (Tau -Exon 10) bzw. vier (Tau +Exon 10) Mikrotubuli-Bindungsmotiven generiert. Bei der Frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt an Chromosom 17 (FTDP-17) führen bestimmte Spleißmutationen zur Retention von Exon 10. Wie die FTDP-17 gehört auch die Alzheimer-Erkrankung zu den sog. Tauopathien, einer Gruppe von Krankheiten, die durch übermäßige Ablagerungen des Tau-Proteins im Gehirn charakterisiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde an humanem *post mortem* Gewebe untersucht, ob der Alzheimer-Erkrankung ein Fehler im Regulationsmechanismus des alternativen Spleißens zugrunde liegt. Mittels RT-PCR und Western Blot wurde das Spleißmuster von Tau Exon 10, dem humanen Transformer2-beta (Htra2- β) und der CDC-ähnlichen Kinase2 (Clk2) untersucht. Ebenso wie Tau Exon 10 werden auch Htra2- β und Clk2 alternativ gespleißt, wodurch Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen entstehen können. Auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass es im präfrontalen und temporalen Kortex der Alzheimer-Gehirne im Vergleich zu Kontrollhirnen zu einer signifikant stärkeren Expression der Isoform tau +Exon10 kommt. Ein möglicher Mechanismus könnte die Regulation des in Zellkulturexperimenten beobachteten Einflusses von hTRA2- β auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 sein. Die im Temporalkortex der Alzheimer-Patienten verstärkt exprimierte Isoform htra2- β 1 unterstützt diese Befunde. Ebenfalls aus Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass CLK2 sowohl das alternative Spleißen von Htra2- β wie auch wahrscheinlich indirekt das von Tau Exon 10 beeinflusst. Untersuchungen zur RNA-Expression von clk2 ergaben, dass die phosphorylierungsaktive Isoform clk2 +Exon 4 in allen untersuchten Regionen bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant vermindert exprimiert wird. Dies deutet auf ein Zusammenspiel zwischen Clk2, Htra2- β und dem alternativen Spleißen von Tau Exon 10 hin, sodass man sowohl von Htra2- β wie auch Clk2 einen Einfluss auf die Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 annehmen könnte.

Basierend auf Forschungsergebnissen zum Einfluss von Phosphatase-Inhibitoren auf alternatives Spleißen in der spinalen Muskelatrophie (SMA), ist es denkbar, mittels spezifischer Phosphatase-Inhibitoren Einfluss auf die Fehlregulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 zu nehmen. So könnten beispielsweise Phosphatase-Inhibitoren gegen htra2- β 1 eine verstärkte Phosphorylierung dieses Proteins bewirken und somit den

Ausschluss von Tau Exon 10 verstärken. Dieser Mechanismus könnte für die Etablierung eines neuen Therapieansatzes herangezogen werden.

2 Einleitung

2.1 Einteilung und Epidemiologie verschiedener Demenzformen

Unter einer Demenz versteht man einen erworbenen Verlust von höheren psychischen Funktionen. Charakteristisch ist eine objektiv nachweisbare erworbene Beeinträchtigung des Gedächtnisses (v.a. der Lernfähigkeit für neue Informationen, Reproduktion von Erinnerungen) sowie ein zunehmender Verlust früherer intellektueller Fähigkeiten (v.a. abstraktes Denken, Urteilsvermögen, Konzentrationsfähigkeit). Die Störungen dürfen nicht mit einer Bewusstseinsstrübung einhergehen [12]. Demenzen manifestieren sich i.d.R. im fortgeschrittenen Lebensalter. So findet man um das 60ste Lebensjahr eine Prävalenz von ca. 1%. Danach kommt es zu einem exponentiellen Anstieg, sodass im Alter von 65 Jahren bereits ca. 10% aller Menschen betroffen sind. Bei den über 90jährigen werden ca. 40% als dement diagnostiziert. Bezogen auf die Bundesrepublik Deutschland bedeutet dies, dass von den über 12 Millionen alter und sehr alter Menschen 1-1,5 Millionen an einer Demenz leiden, darunter ca. 70% Frauen [13;14]. In den Industrieländern gilt die Alzheimer-Erkrankung mittlerweile als vierthäufigste Todesursache [15].

Den Hauptanteil aller Demenzen stellt die Alzheimer-Erkrankung mit 60-80% aller Fälle dar. Je ca. 10% entfallen auf die Lewy-Körper-Erkrankung, vaskuläre Demenzen und Mischformen zwischen AD und vaskulärer Demenz. Seltene Demenzformen sind die supranukleäre Blickparese (PSP), die kortikobasale Demenz (CBD) und die Pick'sche Erkrankung [13]. Aus diesen Daten und der Tatsache, dass in den nächsten zwei Jahrzehnten die Zahl der über 60-Jährigen (Deutschland) um über 50% ansteigen wird, ist ersichtlich, dass die AD auch aus dem Blickwinkel gesundheitsökonomischer Aspekte nicht außer Acht gelassen werden darf. Amerikanische Studien konnten zeigen, dass sich die pro Kopf Ausgaben für einen AD-Patienten auf bis zu 75.000 US-Dollar pro Jahr belaufen können [16].

2.2 Symptomatik und Verlauf der Alzheimer-Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankung (AD) wurde erstmals von ihrem Namensgeber, dem deutschen Psychiater Aloys Alzheimer (1864-1915) beschrieben („Über einen eigenartigen, schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde“, 1906) [17]. Die Alzheimer-Erkrankung ist eine progressive, primär degenerative Erkrankung des Gehirns mit charakteristischen neuropathologischen und neurophysiologischen Merkmalen. Diese Form der Demenz ist

gekennzeichnet durch einen schleichenden Beginn und ein stetiges aber unaufhaltsames Fortschreiten des Krankheitsprozesses. Man unterscheidet die seltene präsenile bzw. familiäre Alzheimer-Demenz (ca. 5%, autosomal-dominant vererbt, Erkrankung tritt vor dem 65. Lebensjahr auf) von der senilen bzw. sporadischen Alzheimer-Demenz (Erkrankung setzt nach dem 65. Lebensjahr ein) [18]. Zwischen den zwei Varianten bestehen histopathologisch, biochemisch und klinisch nur quantitative, aber keine qualitativen Unterschiede [19].

Die Symptomatik der AD ist vielgestaltig, anfangs unspezifisch und von Patient zu Patient unterschiedlich stark ausgeprägt. Dennoch zeichnet sie sich bereits in der Frühphase durch eine progrediente Verschlechterung des Gedächtnisses (v.a. des Kurzzeitgedächtnisses), der

kognitiven Funktionen und der spezifischen kognitiven Leistungen (Aphasie, Apraxie, Agnosie) aus [20]. Die Fähigkeit zur selbständigen Lebensführung ist in diesen noch weitgehend erhalten, der Patient braucht lediglich bei der Bewältigung komplexer Tätigkeiten Unterstützung (Abb. 1). Im weiteren Verlauf können Orientierungsstörungen in Raum und Zeit, Störung der Urteilsfähigkeit, Aggressivität und psychomotorische Unruhe hinzutreten. Auch die Persönlichkeit des Patienten, die trotz allem lange erkennbar ist, kann sich nun

verändern. In diesem Stadium der Erkrankung ist die Eigenständigkeit bereits stark eingeschränkt, d.h. die Betroffenen benötigen selbst bei einfachen alltäglichen Aufgaben wie z.B. Waschen, Anziehen und Essen Hilfe von anderen Menschen. In der Spätphase der Erkrankung ist die selbstständige Lebensführung vollständig aufgehoben; stereotype motorische Bewegungsmuster, Hilfsbedürftigkeit, Bettlägerigkeit und Inkontinenz sind kennzeichnend [19]. Nach dem Auftreten der ersten Symptome liegt die Lebenserwartung im Mittel bei 10 Jahren, die häufigste Todesursache stellt die Bronchopneumonie dar.

Der beschriebene Krankheitsverlauf spiegelt sich in Veränderungen von Hirnstrukturen wider.

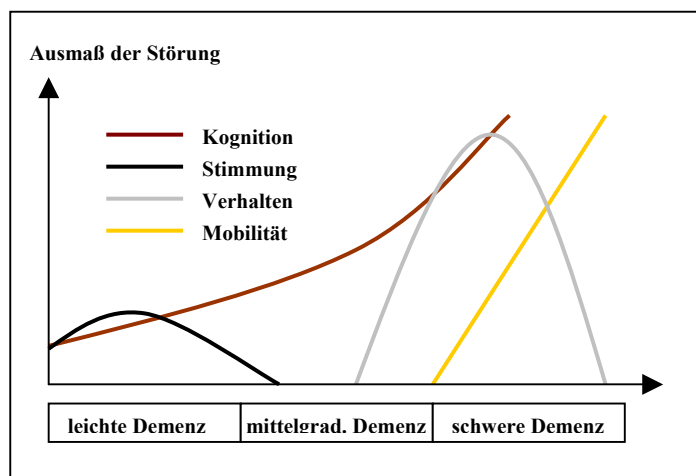


Abb. 1: Beeinträchtigung einzelner Funktionen im Krankheitsverlauf der Alzheimer-Erkrankung [4]

Neben der anfänglichen Veränderung der Stimmungslage zeigt dieses Schema die charakteristischen Defizite in der Kognition. Sie treten bereits bei leichter Demenz auf und sind durch ihren progredienten Verlauf gekennzeichnet. Verhaltensstrukturen und Mobilität werden erst in späteren Stadien beeinträchtigt.

2.3 Neuropathologie

Kennzeichnend für die Alzheimer-Erkrankung sind umfangreiche Ablagerungen im Gehirn, die für neurodegenerative Prozesse mitverantwortlich gemacht werden. Neben intrazellulären neurofibrillären Bündeln treten charakteristischerweise extrazelluläre senile Plaques auf.

2.3.1 Amyloid-Plaques

Hauptbestandteil der senilen Plaques ist das β -Amyloid Protein ($A\beta$), das *in vivo* in zwei Subtypen auftritt. $A\beta_{40}$ endet mit der Aminosäure (AS) Val40, $A\beta_{42}$ mit Ala42, wodurch letzteres um zwei Aminosäuren länger ist. Hierdurch ist dieses Molekül stärker hydrophob, wodurch es ein höheres Aggregationspotential besitzt [21]. Beide $A\beta$ -Formen entstehen durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Protein (*β -amyloid precursor proteins*, APP). APP ist ein Transmembranprotein, das im synaptischen Spalt lokalisiert ist, axonal transportiert wird und in Synapsenfunktionen eingreifen kann [22;23].

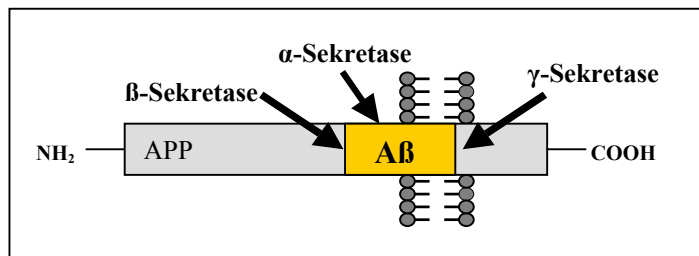


Abb. 2: Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung von APP

Über den β -Sekretaseweg entsteht $A\beta$ durch proteolytische Aktivität der β -Sekretase (BACE) und γ -Sekretase. Auf dem α -Sekretaseweg dagegen wird dieses unterbunden, da die α -Sekretase innerhalb von $A\beta$ schneidet.

Es besitzt eine große extrazelluläre Domäne und einen kurzen zytoplasmatischen Teil [24]. $A\beta$ beginnt in der extrazellulären Domäne (28 AS) und erstreckt sich bis in die Transmembranregion hinein (12 bzw. 14 AS) [21]. Ein Teil des APP wird durch Proteasen gespalten, die ursprünglich als α -, β - und γ -Sekretasen bezeichnet wurden (Abb. 2) [25]. Die Prozessierung durch die α -Sekretase erfolgt innerhalb der $A\beta$ -Region zwischen Lys16 und Leu17 auf der luminalen Seite des Proteins (α -Sekretaseweg). Durch die anschließende Spaltung der γ -Sekretase entstehen die drei Spaltprodukte p3, C83 und α APPs. Letzteres besitzt neuroprotektive Eigenschaften [25]. $A\beta$ kann auf diesem Weg nicht entstehen. Im Gegensatz hierzu greift die β -Sekretase (*beta-site APP cleaving enzyme*, BACE) am N-terminalen Ende der $A\beta$ -Sequenz an, es entstehen zunächst die lösliche Form des APP (APP_{β}) und das C99 Fragment. Durch anschließendes Schneiden der γ -Sekretase wird entweder $A\beta_{40}$ oder $A\beta_{42}$ freigesetzt (β -Sekretaseweg) [21].

Durch fortschreitende Akkumulation und Aggregation von A β entstehen die senilen Plaques. Man unterscheidet diffuse, primitive, neuritische und „*burned-out*“ Plaques. Aus chronologischer Sicht betrachtet treten diffuse Plaques als erste auf. Ihre Struktur ist granulär, amorph und nicht-fibrillär. Die anderen Typen zeigen Amyloidfibrillen und gehen i.d.R. mit dystrophierenden Neuriten und Gliareaktionen einher. Primitive A β -Ablagerungen sind rund und granulär. Die klassischen neuritischen Plaques besitzen einen zentralen A β -Kern mit hellerem Hof und peripherem Kranz granulärer A β -Ablagerungen. Die „*burned-out*“ Plaques mit ihrem nackten, dichten Amyloidkernen stellen das Endstadium dar [26].

Amyloid-Ablagerungen treten vorwiegend in der Entorhinalrinde, dem Hippocampus und der Großhirnrinde auf, in fortgeschrittenen Stadien sind auch Stammganglien, Kleinhirnrinde und andere subkortikale Strukturen betroffen [26;27]. Im Gegensatz zu den Tau-Ablagerungen, die in der Demenzprogression stetig zunehmen, zeigen A β -Plaques kaum Zunahme bzw. sogar geringe Abnahmetendenz [28].

Das Verteilungsmuster der Amyloid-Ablagerungen entspricht nicht dem der neurofibrillären Veränderungen. Erste neurofibrilläre Veränderungen treten in Abwesenheit von Amyloid-Ablagerungen auf und nur die Endstadien der AD sind durch das Auftreten beider Läsionen gekennzeichnet. Diese Erkenntnisse lassen sich nicht mit der Amyloid-Hypothese vereinbaren [29], die davon ausgeht, dass die Neurodegeneration in der Alzheimer-Erkrankung durch A β -Deposite verursacht wird. Es gibt keine aussagekräftigen Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Amyloid-Ablagerungen und dem Schweregrad der kortikalen Dysfunktion, wodurch A β -Plaques als alleinige Auslöser neurodegenerativer Prozesse ausgeschlossen werden können [30]. Viel wahrscheinlicher ist ein Zusammenspiel beider Faktoren.

2.3.2 Neurofibrilläre Bündel

Neurofibrilläre Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFTs) sind unlösliche fibrilläre Ablagerungen, deren Hauptkomponente abnorm hyperphosphoryliertes Protein Tau darstellt. In einer Gruppe von Erkrankungen, den sog. Tauopathien, stellen stark ausgeprägte neurofibrilläre Tau-Ablagerungen im Gehirn das charakteristische Merkmal dar. Verteilungsmuster und Zusammensetzung dieser Ablagerungen haben differenzialdiagnostische Bedeutung. NFTs können sowohl in Neuronen wie auch in Gliazellen auftreten (Tab. 1).

Tab. 1: Wichtige Tauopathien und ihre Ablagerungen im ZNS (nach [31;32])

Erkrankung	Tau-Isoformen	Taupathologie		AB
		Neuronen	Gliazellen	
Alzheimer-Erkrankung	alle 6 lt. Ergebnissen dieser Arbeit in verändertem Ver- hältnis zueinander	NFT und NF PHF (Ø 10-22nm, Periodizität 80nm) SF (Ø 20-24 nm, 5% d. NFT)	sehr selten	+
FDTP-17	je Familie unterschiedlich (alle 6, nur 4R oder nur 3R)	NFT und NF PHF (Ø, Periodizität 100nm) SF gedrillte bandähnliche Fila- mente	alle Formen je nach Familie	--
Morbus Pick (PiD)	nur 3R	Pick Körperchen, aufgeblähte Neuronen (Pickzellen)	büschelförmige Astro- zyten	--
Kortikobasale Degeneration (CBD)	nur 4R	NFT und NF PHF (Ø 13-18nm, Periodizität 160-200nm) SF	astrozytische Plaques, dornenförmige Astro- zyten <i>coild bodies</i> in Oligo- dendrozyten	--
Progressive supranukleäre Blicklähmung (PSP)	nur 4R	NFT und NF PHF (Ø 10-24nm, Periodizität 150-300nm) SF (Ø 15-18nm)	dornen- und büschel- förmige Astrozyten <i>coild bodies</i> in Oligo- dendrozyten	--

NF Neuropilfäden, **PHF** paarige helikale Filamente, **SF** gerade Filamente

2.3.2.1 Tau-Filamente

Bei ultrastruktureller Analyse der neurofibrillären Bündel, sind drei unterschiedliche Filamentstrukturen zu erkennen (Abb. 3) [9]:

1. Paarig spiralförmig angeordnete Filamente (*paired helical filaments*, PHFs)

- bestehen aus zwei Einzelsträngen, die sich periodisch in einem bestimmten Abstand (z.B. AD: 80nm, FTDP-17: 100nm, CBD: 160-200nm) überkreuzen
- Durchmesser ca. 10-22nm
- Hauptbestandteil der NFTs der Alzheimer-Erkrankung

2. einsträngige Filamente (*straight filaments*, SFs)

- weisen keine periodische Helixstruktur auf
- Durchmesser variierend (z.B. AD: 20-24 nm, PSP: 15-18nm)
- Häufigkeit in AD ca. 5%

3. gedrillte bandähnliche Filamente (*twisted-ribbon-like filaments*)

- beispielsweise in der FTDP-17 und Multisystem-Tauopathie mit präseniler Demenz (MSTD)
- treten nicht bei AD auf

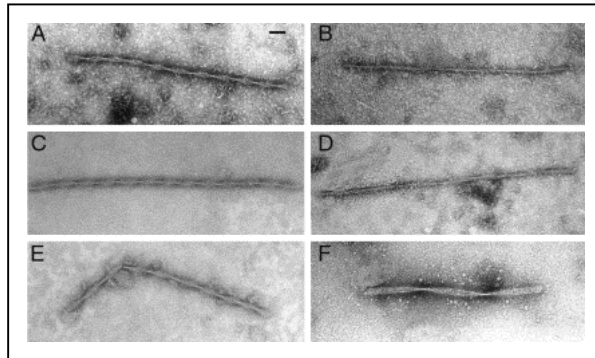


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Tau-Filamente

A PHF der Alzheimer-Erkrankung B SF der PSP C PHF beim Down Syndrom D SF bei Morbus Pick E PHF der Seattle Familie A (FTDP-17 mit V337M Mutation im Tau-Gen) F gedrillte bandähnliche Filamente der familiären MSTD.

Der Balken in Bild A entspricht einem Maßstab von 100nm (aus [9]).

2.3.2.2 Entstehung der NFTs

Morphologisch können drei Subtypen neurofibrillärer Bündel unterschieden werden. Im frühesten Stadium, dem sog. *pretangle stage* (Abb. 4, Gruppe 1 und 2), findet man eine Anhäufung von hyperphosphoryliertem Tau (tau-p), das gleichmäßig über alle Bereiche des Perikaryons und der Zellfortsätze verteilt ist, ohne dass eine Formation in NFTs oder Neuropilfäden (NFs) erkennbar ist [8;33]. *Pretangle* Neuronen sind nicht argyrophil, d.h. ihr Nachweis ist nur immunhistochemisch mit spezifischen phosphorylierungsabhängigen Anti-Tau Antikörper möglich (z.B. AT8, gerichtet gegen abnorm phosphorylierte Phosphoepitope des Tau-Proteins). Im darauf folgenden Stadium führt die Akkumulation von tau-p zur Bildung der klassischen NFTs in den Somata und NFs in den dentritischen Fortsätzen (Abb. 4, Gruppe 3 und 4). Diese Ablagerungen können leicht mit Silberfärbungen wie z.B. der Gallyas Färbung nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf kommt es zur Quervernetzung der einzelnen Tau-Aggregate untereinander, die wiederum eine Ursache für die ausgeprägte Unlöslichkeit der *tangles* darstellen könnte. Im Endeffekt gehen die formveränderten Zellen zugrunde und die ehemals intrazellulär auftretenden NFTs bzw. NFs liegen nun extrazellulär vor. Sie werden als sog. *ghost tangles* oder *tomb stones* bezeichnet (Abb. 4, Gruppe 4 und 5).

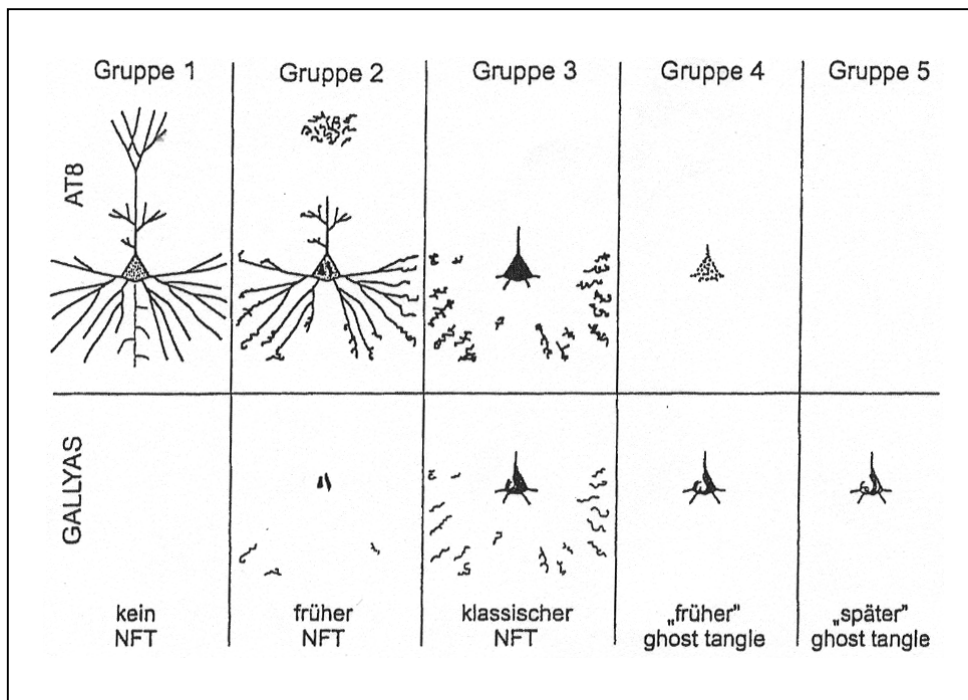


Abb. 4: Entwicklung eines neurofibrillären Bündels (NFT) in einer kortikalen Pyramidenzelle bei der Alzheimer-Erkrankung (aus [8])

Obere Reihe: Strukturen, die durch den Antikörper AT8 dargestellt werden können, der abnorm phosphorylierte Tau-Protein Strukturen erkennen kann.

Untere Reihe: Versilberbare Veränderungen.

In der frühen Phase (Gruppe 1) tritt das abnorm phosphorylierte Tau zunächst fein verteilt in einem löslichen Zustand auf. Diese Veränderungen sind zunächst nicht argyrophil. Mit der Entstehung argyrophiler NFTs erleiden die Zellen morphologische Veränderungen wie z.B. eine Fragmentierung der distalen Dendritenabschnitte (Gruppe 2 und 3). Nach dem Untergang der Zelle (Gruppe 4 und 5) bleibt ein extrazellulärer *ghost tangle* zurück, der seine Tau-Immunoreaktivität allmählich einbüßt.

Die Ursache für die Selbstaggregation des Tau-Proteins ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden. Die abnorme Phosphorylierung scheint allerdings weder hinreichend noch notwendig zu sein.

Wahrscheinlich kann sich Tau in einem hyperphosphorylierten Zustand nicht mehr entsprechend an die Mikrotubuli binden und löst sich von diesen. Hierdurch erhöht sich der Pool von ungebundemem Tau, was wiederum zur verstärkten Aggregation führen könnte. Möglicherweise wirken sich auch polyanionische Verbindungen wie Heparansulfat oder Ribonukleinsäuren fördernd auf die Aggregation aus [31].

2.3.2.3 Verteilungsmuster der NFTs in der Alzheimer-Erkrankung

Charakteristisch für hirnmorphologische Veränderung in der Alzheimer-Erkrankung sind neben Amyloid-Plaques die neurofibrillären Bündel (NFTs). Beide führen zum Untergang von Gewebe, wobei die Ablagerung der NFTs zeitlich und räumlich einem ganz bestimmten Muster folgt. Dieses wurde Mitte der 90er Jahre von Braak und Braak beschrieben [30;34]. Je nach Ausmaß und Lokalisation der Ablagerung neurofibrillärer Bündel erfolgt die Einteilung in sechs Stadien (Abb. 5):

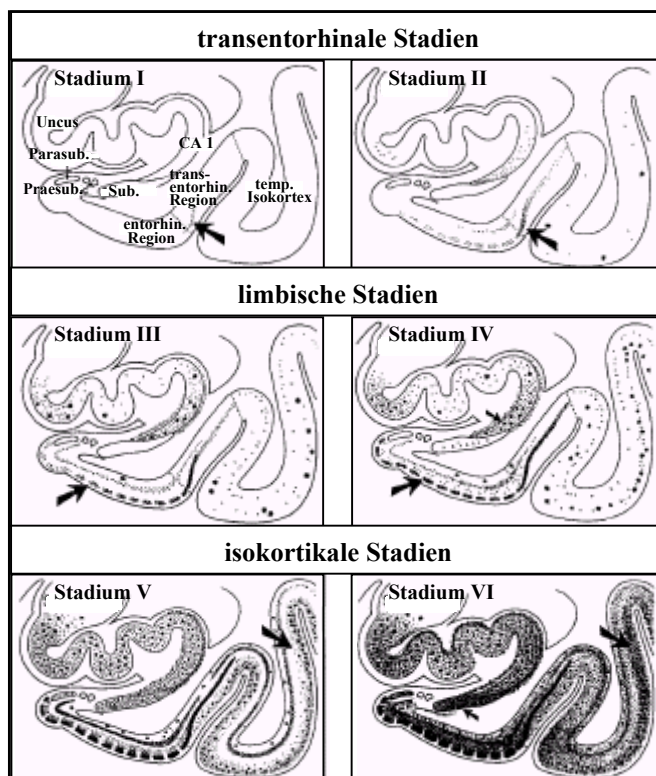


Abb. 5: Schematische Darstellung der sechs Braak-Stadien (nach [3])

Frontalschnitt durch die Temporalregion. Fortschreitende neurofibrilläre Veränderungen, die in der Hippocampus Formation, der entorhinalen wie transentorhinalen Region und dem anschließenden Temporalisokortex auftreten. Pfeile weisen auf das Hauptcharakteristikum des jeweiligen Stadiums hin.

CA 1 erster Sektor des Ammon's Horn, **Parasub.** Parasubiculum, **Präsub.** Präsubiculum, **Sub.** Subiculum.

Transentorhinale Stadien I-II:

Es sind nur die α -Zellschichten der Lamina principalis externa in der Regio transentorhinalis betroffen. Klinische Anzeichen sind nicht erkennbar, wodurch die transentorhinalen Stadien I und II auch als klinisch stumme Stadien bezeichnet werden.

Limbische Stadien III-IV:

Schwerwiegende Veränderungen treten nur in wenigen Regionen des Allokortex auf, der Neokortex ist zum größten Teil nicht involviert. Auch makroskopisch ist keine Atrophie erkennbar. Hauptmerkmale von Stadium III sind eine starke Zerstörung der α -Zellschichten der Lamina principalis externa in der Regio transentorhinalis wie auch in der Regio

entorhinalis und schwache Veränderungen im Hippocampus bei Abwesenheit neokortikaler Veränderungen. Das Stadium IV zeigt zusätzlich Atrophien in den tiefer liegenden α -Zellschichten der Lamina principalis interna.

Viele Patienten zeigen in diesen Stadien bereits erste Störungen kognitiver Funktionen und unterschwellig Veränderungen der Persönlichkeit. Obwohl nur zwei Zellschichten betroffen sind, werden Zentren beschädigt, die für die Projektion zwischen Neokortex und Hippocampus essentiell sind. Ihre Atrophie führt zur Zerstörung des limbischen Kreislafs.

Neokortikale Stadien V-VI:

Diese Endstadien sind durch stark ausgeprägte Ablagerungen neurofibrillärer Bündel und Neuropilfäden gekennzeichnet, die in nahezu allen Untereinheiten des zerebralen Kortex auftreten. Neokortikale Assoziationszentren sind stark zerstört. Konventionsgemäß bestätigen diese Stadien neuropathologisch eine Alzheimer-Erkrankung.

Das beschriebene Ausbreitungsmuster korreliert mit den in der AD früh auftretenden Gedächtnisstörungen infolge unterbrochener Leitungsbahnen zum Hippocampus, denen später Störungen höherer Hirnleistungen folgen. Anders als bei den Amyloid-Plaques steht die Dichte der NFTs in enger Korrelation zum Schweregrad der Alzheimer-Demenz [35-37].

2.4 Das Tau-Protein

Das Tau-Protein wurde erstmals vor mehr als 25 Jahren biochemisch charakterisiert [38]. Es stellt ein niedermolekulares Protein [39] mit wenig oder nicht detektierbarer Sekundärstruktur dar [40], das bis heute nicht kristallisiert werden konnte. Tau-Proteine gehören zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) [41], die u.a. in *C. elegans* [42], *Drosophila* [43;44], Goldfischen [45], Ochsenfröschen [46], Nagetieren [47;48], sowie von Affen [49] und Menschen [50;51] vorkommen. Humanes Tau-Protein wird hauptsächlich in den Neuronen des

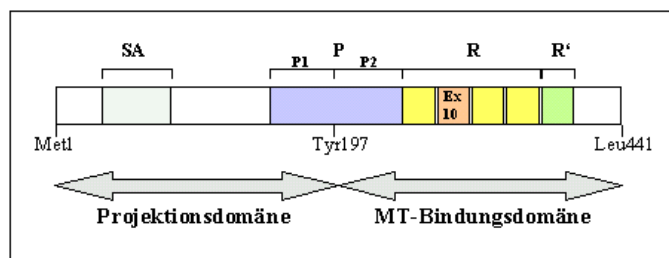


Abb. 6: Domänenstruktur des Tau-Proteins

Die C-terminale Bindungsdomäne kann aufgrund ihres basischen Charakters negativen Ladungen kompensieren, wodurch Bindung an MT ermöglicht werden. Die saure N-terminale Projektionsdomäne dagegen fungiert aufgrund von Abstoßungskräften eher als „Abstandshalter“.

SA Saure Region, **P** Prolin-reiche Region, **R** Repeat-Region, **R'** „fünfter“ Repeat

zentralen Nervensystems und dort vorwiegend in den Axonen exprimiert. Astrozyten und Oligodendrozyten dagegen weisen es kaum auf [52-54].

2.4.1 Funktion und Struktur des Tau-Proteins

2.4.1.1 Funktion des Tau-Proteins

Der Mikrotubuli-Apparat einer Zelle stellt ihr inneres Skelett dar und spielt in einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine fundamentale Rolle. Mikrotubuli dienen als „Schiene“ für längsaxonale Transportvorgänge (Transport von Moto-Proteinen wie Kinesin, Dynein) [55] und sind an der Regulation der Zellform wie auch der Zellpolarität maßgeblich beteiligt [56;57].

Mikrotubuli entstehen durch *head to tail* Polymerisation von $\alpha\beta$ -Tubulin Dimeren, deren Tendenz es ist, zwischen Phasen der Polymerisation und Depolymerisation zu wechseln, und somit eine dynamische Instabilität besitzen [58]. Diese wiederum ist grundlegende Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des Mikrotubuli-Apparates. Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) können diese dynamische Stabilität beeinflussen, indem sie an Mikrotubuli binden und sie dadurch stabilisieren (Abb. 7) [59].

In Neuronen spielen v.a. die Proteine

Tau und MAP2 (*microtubule associated protein 2*) eine wichtige Rolle, da sie bereits während der Entwicklung der Dendriten und Axone Einfluss auf diese Dynamik nehmen können [60;61].

Die Funktion des Tau-Proteins scheint maßgeblich vom Grad seiner Phosphorylierung abhängig zu sein. So kann beispielsweise eine Hyperphosphorylierung von löslichem Tau die Aggregation des Proteins zu PHF verstärken [62-64] und die Phosphorylierung spezifischer Tau-Phosphorylierungsepitope eine Dissoziation von den Tubulin-Einheiten bewirken (Abb. 7) [5;60;65].

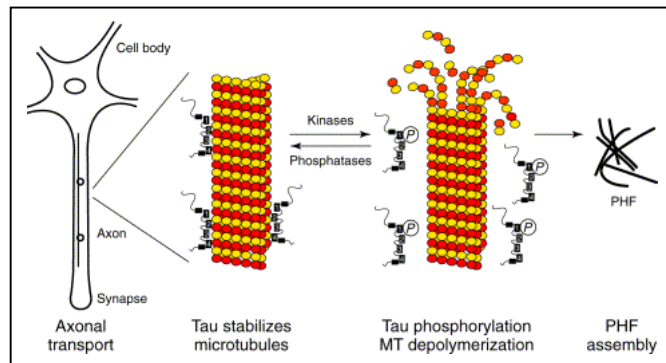


Abb. 7: Model für den möglichen Zusammenhang zwischen axonalen Transportvorgängen, Mikrotubulis und dem Tau-Protein in der Alzheimer-Erkrankung [5]

Mikrotubuli dienen bei längsaxonalen Transportvorgängen als Transportschienen. An ihrer Stabilisierung sind Tau-Proteine maßgeblich beteiligt. Durch Phosphorylierung spezieller Phosphorylierungsstellen kann es sich von seinen Bindungsstellen lösen, was einerseits zu einem Zusammenbruch der Mikrotubuli-Struktur führt und andererseits die Akkumulation von Tau zu PHFs begünstigt.

Basierend auf der Art der Interaktionen mit anderen Molekülen kann das Tau-Protein funktionell in die C-terminale Mikrotubuli-Bindungsdomäne (Interaktion mit MT) und die N-terminale Projektionsdomäne (Wechselwirkung mit Zellkompartimenten und der Plasmamembran) unterteilt werden (Abb. 6, S. 17).

2.4.1.2 Bindungsdomäne

Die Mikrotubuli-Bindungsdomäne des Tau-Proteins besteht aus drei (3R-Tau) oder vier (4R-Tau) hochkonservierten 18-Aminosäure (AS) langen Mikrotubuli-Bindungsmotiven, die durch flexible, weniger konservierte Zwischensequenzen (13-14 AS) voneinander getrennt sind [66]. Alle nativen Tau-Isoformen können stark an Mikrotubuli binden, wobei sowohl die Affinität der MT-Bindungsdomäne zu den Mikrotubuli wie auch die Fähigkeit, das Polymer

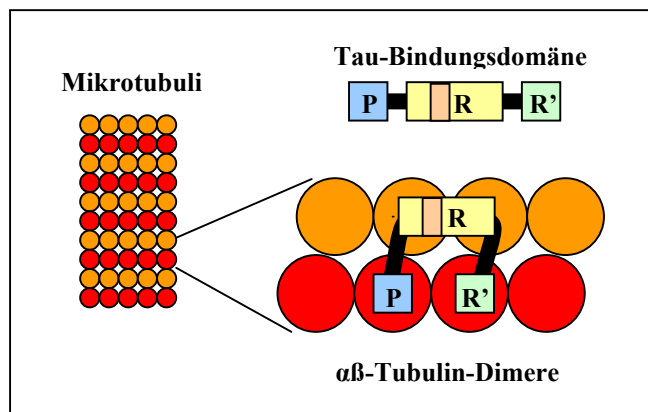


Abb. 8: Interaktion des Tau Proteins mit den Tubulin-Einheiten der Mikrotubuli (nach [7])

Rote und orange Kreise symbolisieren die $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimere. Die unterschiedlichen Bereiche der MT-Bindungsdomäne ermöglichen es dem Tau-Protein sich effizient an die Tubulin-Dimere zu binden und den MT-Apparat dadurch zu stabilisieren. **P** Prolin-reiche Region, **R** Repeat-Region, **R'** „fünfter“ Repeat.

stabilisieren zu können, mit der Anzahl der Bindungsmotive steigt [67]. Im Vergleich zu den 3R-Isoformen binden 4R-Tau Isoformen ungefähr dreimal so effektiv an MT [7;67;68]. Auch die Stabilität der MT, die mit 4-R Tau interagieren, ist wesentlich stärker ausgeprägt [69;70]. Art und Reihenfolge der Bindungsmotive scheinen dabei keine Rolle zu spielen. Die Bindungsdomäne alleine genommen bindet allerdings nur schwach. Für effiziente Bindungen sind die flankierenden Regionen P und R' von großer Bedeutung (Abb. 8), da durch sie

eine klammerartige Bindung möglich wird. Eine besondere Bedeutung kommt auch der Zwischensequenz zwischen R1 und R2 zu, die eine mehr als zweifach höhere Bindungsaffinität als jedes einzelne Bindungsmotiv alleine besitzt. Sie tritt nur bei 4R-Tau Isoformen auf und ist scheinbar für deren höhere Bindungseffizienz im Vergleich zu 3R-Tau Isoformen mitverantwortlich [71].

Bis heute ist noch nicht abschließend geklärt wie Tau mit den Mikrotubuli interagiert. Die vorherrschende Meinung geht davon aus, dass jede Einheit, bestehend aus MT-Bindungsmotiv und dazugehöriger Zwischensequenz, mit einem separaten, aber angrenzenden Tubulin-Monomer in der MT-Wand interagiert (Abb. 8) [7;68]. Zwei Modelle

versuchen die strukturelle Begebenheiten zu erklären. Das „longitudinale Bindungsmodell“ besagt, dass die MAPs sich entlang der Protofilamente anlagern und somit die Tubulin-Tubulin-Interaktionen stärken, wodurch eine Dissoziation an den Enden der MT unterbunden wird [72]. Dem entgegen beschreibt das „laterale Bindungsmodell“, dass sich die MAPs um das Filament legen und somit die Trennung der Protofilamente voneinander verhindern [73]. Unabhängig davon konnten *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass sich Tau mittels seiner Bindungsdomäne selbst zu PHF-ähnlichen Filamenten zusammenlagern kann [74].

2.4.1.3 Projektionsdomäne

Anders als die MT-Bindungsdomäne scheint die Projektionsdomäne des Tau-Proteins nicht an der Bindung an die MT beteiligt zu sein [75]. Im Gegensatz zur Bindungsdomäne, die durch ihren basischen Charakter die negativen Ladungen der MT kompensieren kann, führt die saure Region der Projektionsdomäne zu Abstoßungsreaktionen, wodurch dieser Abschnitt als eine Art Abstandshalter agieren kann [7]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Mikrotubuli, die an Tau gebunden sind, eine Parallelstruktur aufweisen, wobei der Abstand der Protofilamente mit der Länge der Projektionsdomäne korreliert [76;77]. Da die auf der Projektionsdomäne liegenden Exons 2 und 3 alternativen Spleißprozessen unterliegen, können Isoformen entstehen, deren Projektionsdomäne unterschiedliche Ausmaße besitzen. Hierdurch könnte der axonale Durchmesser durch Tau und andere MAP mitbestimmt werden. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass nur im peripheren Nervensystem das sog. *big tau* (Einschluss von Exon 4a) exprimiert wird, dem Bereich des Nervensystems, in dem Axone mit wesentlich größerem Durchmesser auftreten [78;79].

Durch seine N-terminale Domäne kann Tau mit anderen neuronalen Zellkompartimenten und der Plasmamembran in Wechselwirkung treten, was wiederum zur Stabilisierung der MT beitragen kann [80].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die klassische Funktion des Tau-Proteins in der Stabilisierung neuronaler Mikrotubuli liegt. In der Förderung der Polymerisation von Tubulin-Dimeren und dem dadurch bedingten Wachstum von Neuriten spielt es jedoch ebenso eine Rolle wie in der Anordnung der MT-Protofilamente [81-85]. Darüber hinaus wird eine „Ankerfunktion“ für andere Proteine und Enzyme diskutiert [86].

2.4.2 Genorganisation

Das humane Tau-Protein wird durch ein einziges Gen kodiert, das über 100kb umfasst und auf dem langen Arm von Chromosom 17 auf der Position 17q21 lokalisiert ist [87]. Die prä-

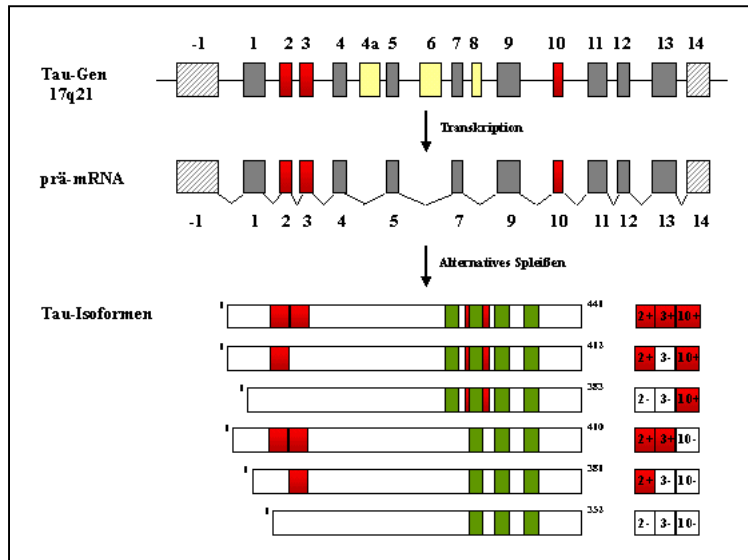


Abb. 9: Schematische Darstellung des humanen Tau Gens, des Primärtranskripts und der sechs im menschlichen Gehirn vorkommenden Tau Isoformen

Je nach Ein- oder Ausschluss von Exon 10 können die Transkripte in 3R- (-Exon10) bzw. 4R- (+Exon10) Isoformen unterteilt werden. Boxen symbolisieren Exons, Striche Introns (nach [10]).

mRNA besteht aus 16 Exons, von denen jedoch die Exons 4a, 6 und 8 charakteristisch für Proteine des peripheren Nervensystems sind und somit nicht in der mRNA des menschlichen Gehirns auftreten. Isoformen mit Exon 4a-Einschluss werden aufgrund ihres höheren Molekulargewichts auch als „big tau“ bezeichnet. Dieses Exon weist in peripheren Geweben von Mensch, Rind und Nagetieren eine hohe Homologie auf. Tau-mRNA Isoformen, die Exon 6 oder 8 tragen, konnten zwar beim

Menschen bisher noch nicht detektiert werden, treten aber in Gehirnen von Rhesusaffen und Rindern auf [49;66].

Exon -1 als Bestandteil des Promoters und Exon 14 als 3' UTR werden zwar transkribiert, anschließend allerdings nicht translatiert. Bei den Exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 und 13 handelt es sich um konstitutive Exons [50;51;78], wohingegen die Exons 2, 3 und 10 alternativ gespleißt werden. Sie sind spezifisch für das adulte Gehirn [78]. Exon 3 tritt niemals unabhängig von Exon 2 auf [88]. Insgesamt können sechs Isoformen mit einer Länge zwischen 352 und 441 AS generiert werden: 2-3-10-, 2+3-10-, 2+3+10-, 2-3-10+, 2+3-10+ und 2+3+10+ [50;51;89] (Abb. 9). Diese alternativen Spleißprozesse sind entwicklungsspezifisch, sodass beispielsweise im fetalen Gehirn nur die kürzeste Isoform (2-3-10-) exprimiert wird, wohingegen im Erwachsenen Gehirn alle sechs Isoformen auftreten können [50;78].

Exon 10 kodiert für die zweite von vier Sequenzwiederholungen, die die Mikrotubuli-Bindungsdomäne des Tau-Proteins darstellen. Einschluss des Exons führt zu Isoformen mit vier Bindungsmotiven (4R), Ausschluss zu Isoformen mit nur drei Bindungsmotiven (3R).

Das alternative Spleißen von Tau Exon 10 ist humanspezifisch, wobei das Verhältnis der Isoformen 3R/4R-Tau im adulten menschlichen Gehirn ungefähr 1:1 beträgt [39].

2.4.3 Spleißen

2.4.3.1 Allgemeine Grundlagen

Gene eukaryontischer Zellen sind im Gegensatz zu bakteriellen nicht kontinuierlich aufgebaut [90], d.h. sie bestehen aus einer Abfolge von kodierenden Sequenzen (Exons) und nicht-kodierenden Sequenzen (Introns). Dabei stellen die Introns mit ca. 95% den Hauptteil dar, nur 5% der prä-mRNA wird tatsächlich in Proteine translatiert. Die Anzahl der Introns innerhalb einer prä-mRNA der höheren Eukaryonten variiert von einem bis zu über 50 Introns, die Anzahl der Exons beträgt im Mittel 8,8. Die Transkription eines DNA-Abschnitts in die prä-mRNA umfasst zunächst sowohl Exons wie auch Introns. Im weiteren Verlauf der Prozessierung werden die Introns entfernt, was als konstitutives Spleißen bezeichnet wird [91]. Spleißprozesse konnten nicht nur in Säugetieren, sondern auch in Hefen festgestellt werden, was zu der Annahme führt, dass diese Vorgänge hoch konservierte Mechanismen darstellen [92]. Bestimmte Sequenzen können zell- oder entwicklungsabhängig entweder als Intron erkannt und herausgeschnitten oder als Exon in die reife mRNA eingebaut werden. Dies wird als alternatives Spleißen bezeichnet.

2.4.3.1.1 Alternatives Spleißen

Zur Erhöhung der Variabilität des Proteoms bedienen sich Metazoa unterschiedlicher Mechanismen. Zu diesen zählen u.a. multiple Transkriptionsstartstellen [93], alternatives prä-mRNA Spleißen [94-97], Polyadenylierung [98], prä-mRNA Editing [99] und post-translationale Proteinmodifikation [100]. Bei den Vertebraten scheint hierbei dem alternativen Spleißen die wichtigste Rolle zuzukommen [94;97]. Untersuchungen von Chromosom 22 [101] und EST Datenvergleiche [102] führen zu der Vermutung, dass ca. 47-59% aller menschlichen Gene alternativ gespleißt werden. So ist es möglich, basierend auf einem Genom, das lediglich 25.000 Gene umschließt [103], ein komplexes Proteom aus schätzungsweise 90.000 bis 1.000.000 Proteinen zu generieren [104;105]. Durch Selektion unterschiedlicher Spleißstellen (Abb. 10) können aus einer prä-mRNA eine Vielzahl unterschiedlicher mRNAs gebildet werden, die wiederum für Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften kodieren. Etwa ein Viertel aller alternativen Exons führt Stopkodons ein oder bewirkt eine Leserasterverschiebung. Hieraus resultieren u.a. verkürzte Proteine mit

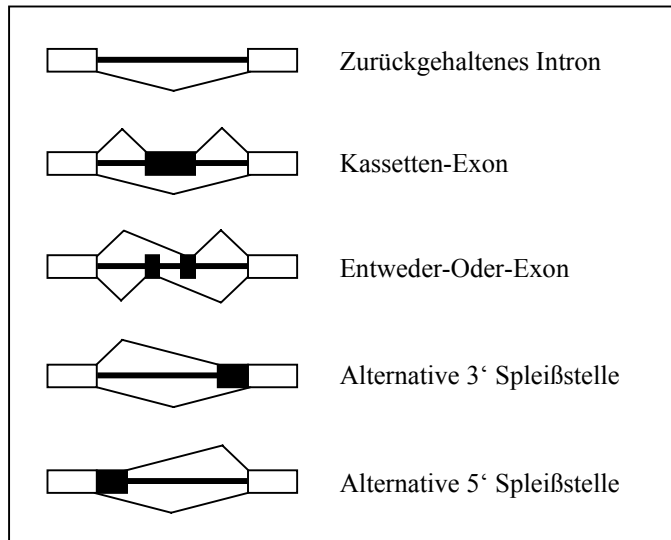


Abb. 10: Alternative Spleißmuster

Schwarze Rechtecke stellen alternative, weiße Rechtecke konstitutiv gespleißte Exons dar. Dicke Linien symbolisieren Introns, einfache Linien stehen für mögliche Exonabfolgen, die beim Spleißen entstehen können.

veränderter oder aufgehobener Funktion [106;107]. Es können beispielsweise Bindungsdomänen verloren gehen, sich Affinitäten zu Liganden [108] ebenso verändern wie Hormonaktivitäten [109] oder Leitungseigenschaften von Ionenkanälen [110].

Die Auswahl alternativer Spleißstellen unterliegt komplexen Regulationsmechanismen, sodass eine präzise Vorhersage über den Ein- oder Ausschluss eines Exons nur mittels Sequenzdaten möglich ist [111].

2.4.3.1.2 Der Spleißapparat (Spleißosom)

Alle Spleißvorgänge finden in sog. Spleißosomen statt, die im Zellkern lokalisiert sind. Diese Spleißapparate stellen hochdynamische Systeme aus ca. 145 Proteinen dar, die je nach Stadium der Spleißreaktion unterschiedliche Konformation und räumliche Orientierung zueinander annehmen [112]. Essentielle Bestandteile dieser komplexen Strukturen sind neben den SR-Proteinen (*arginine/serine-rich proteins*) [113-115] die heteronukleären Ribonukleinproteine (hnRNPs, *heteronuclear ribonucleoproteins*) (Abb. 11) [116;117]. Diese Proteine weisen neben einer RNA-Bindungsdomäne unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionsdomänen auf. Da hnRNPs und SR-Proteine oftmals mit unterschiedlichen Proteinen in Wechselwirkung treten, kann ihr Effekt antagonistisch sein. Für die Bildung des katalytischen Zentrums sind kleine nukleäre Ribonukleinproteine (snRNPs, *small nuclear ribonucleoproteins*) von großer Bedeutung. Sie bestehen aus kleinen nukleären Ribonukleinsäuren (snRNAs, *small nuclear ribonucleic acids*), die an spezifische Proteine gebunden sind. Je nach beteiligter snRNA unterscheidet man die vier Subtypen U1-, U2-, U4/6- und U5-snRNPs [118-120]. Das Zusammenfügen der einzelnen Spleißosomkomponenten zum aktiven Komplex und die eigentliche Spleißreaktion erfolgen

über vier z.T. ATP-abhängige Schritte. Zellbiologische Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass Transkription und prä-mRNA Prozessierung gleichzeitig in einem makromolekularen Komplex ablaufen, der als „RNA Fabrik“ oder „transkriptionaler Komplex“ bezeichnet wird [121;122].

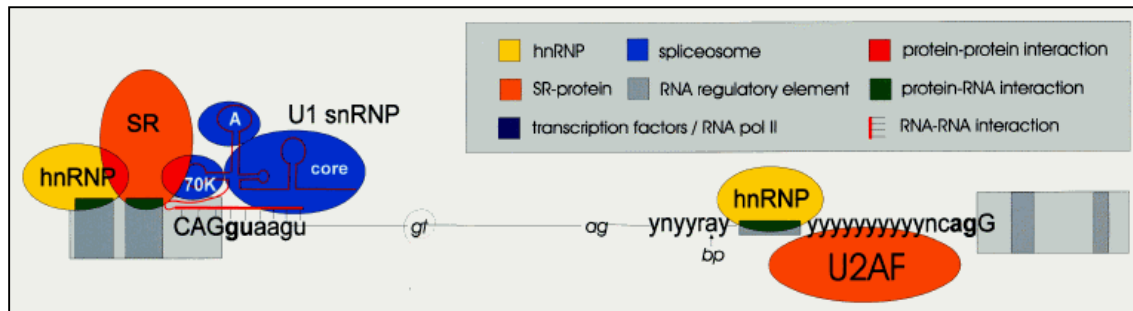


Abb. 11: Regulationsfaktoren bei alternativen Spleißvorgängen

Exons sind als hellgraue Rechtecke, Introns als Linien dargestellt. Regulatorische Elemente (Enhancer, Silencer) sind als dunkelgraue Bänder gekennzeichnet. **CAGguaagu** 5'-Spleißstelle, **(y)₁₀ncagG** 3'-Spleißstelle, **bp** Verzweigungspunkt (y=c oder u; n=a,c,g oder u). Als Großbuchstaben gekennzeichnete Nukleotide verbleiben in der reifen mRNA.

SR-Proteine (orange) und hnRNPs (gelb) binden an die regulatorischen Elemente der prä-mRNA (grün) und interagieren zusätzlich untereinander (rot). Die Bildung eines Multi-Protein-RNA-Komplexes ermöglicht die Unterscheidung zwischen tatsächlichen (fett) und fehlerhaften Spleißstellen (gu/ag), die häufig vorzufinden sind [11].

2.4.3.1.3 Exon-Erkennung

Zu Gewährleistung eines fehlerfreien Ablaufs alternativer Spleißprozesse ist ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren nötig. Dies umfasst zum einen Signale auf der prä-mRNA, die sog. *cis*-Faktoren, zum anderen verschiedene Protein-Gruppen, die mit diesen interagieren (*trans*-Faktoren) [123].

Die wichtigsten *cis*-Elemente stellen neben dem Verzweigungspunkt (*branchpoint*) die 3'- und 5'-Spleißstelle dar [124]. Alle drei Sequenzen sind nur sehr kurz und schwach konserviert [125] (5'-Spleißstelle: CAGguaagu, 3'-Spleißstelle: (y)₁₀ncagG [126], *branch-point*: Adenosin-Baustein im Abstand von 20-40 Nukleotiden stromaufwärts der 3'-Spleißstelle [127]). Um dennoch eine eindeutige Identifizierung der Intron-Exon-Grenze zu ermöglichen, besitzt die RNA in unmittelbarer räumlicher Nähe dieser Sequenzen sowohl auf Exons (ESE = *exonic sequence elements*) wie auch auf Introns (ISE = *intronic sequence elements*) weitere regulierende Elemente [128;129]. Je nachdem, ob sie den Einschluss oder Ausschluss eines Exons unterstützen, werden sie als *enhancer* bzw. *silencer* bezeichnet. Ihre Sequenz ist mit nur 5-8 Nukleotiden sehr kurz, die Basenabfolge sehr flexibel und nur schwach konserviert.

An diese ESE und ISE binden wiederum die *trans*-Faktoren. Die Mehrheit dieser Faktoren kann zwei großen Gruppen zugeordnet werden, den SR-Proteinen und den hnRNPs [130]. Hieraus ist ersichtlich, dass ein fein ausgewogenes Verhältnis zwischen *cis*- und *trans*-Faktoren für den reibungslosen Ablauf der Spleißprozesse von größter Bedeutung ist. Bereits kleine Veränderungen dieser Balance können weitreichende Folgen besitzen.

2.4.3.1.4 Der Spleißprozess

Der Spleißprozess besteht aus zwei nukleophilen Substitutionen 2. Ordnung (S_N2) (Abb. 12). Im ersten Schritt des Spleißprozesses lagert sich die Untereinheit U1 an die 5'-Spleißstelle

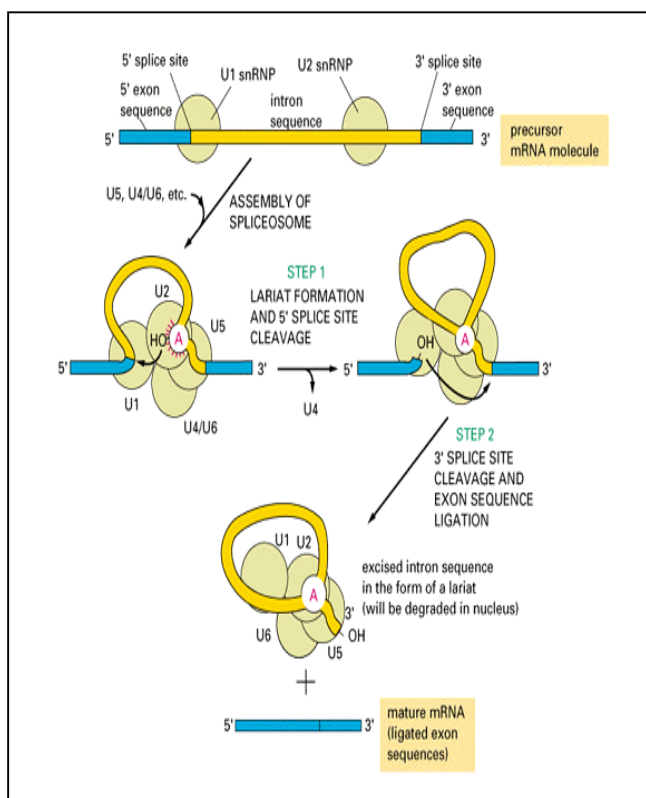


Abb. 12: Spleißprozess [2]

Im Laufe von zwei Umesterungsreaktionen wird das Intron in Form des Lariats aus dem Transkript entfernt.

von Exon 1 an und die Untereinheit U2 an den Verzweigungspunkt von Exon 2. Durch eine Umstrukturierung gelangen die Exongrenzen in räumliche Nähe. Die 5'-Exon-Intron-Grenze öffnet sich und die nun freie vorliegende 5'-Phosphatgruppe kann mit der 2'-Hydroxygruppe des Adenosin-Bausteins eine Esterbindung eingehen (1. Umesterungsreaktion). In der Folge kommt es zur Lariatbildung und durch Angriff der freien 3'-Hydroxyl-Gruppe des 5'-Exons an die Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle wird das Intron in Form des Lariats aus dem Transkript entfernt (2. Umesterungsreaktion) und im Zellkern abgebaut [131;132].

2.5 SR-Proteine und SR-ähnliche Proteine

SR-Proteine gehören zu einer Familie hoch konservierter essentieller Spleißfaktoren (*trans*-Faktoren), die sowohl bei konstitutiven wie auch bei alternativen Spleißprozessen eine wichtige Rolle einnehmen [113;133]. Die ursprüngliche Definition der SR-Proteine bezog sich auf ihre gemeinsame biochemische Fähigkeit, spleißdefizitäre S100 Extrakte *in vitro* komplementieren zu können [134;135]. Der erste im Säugetier charakterisierte Spleißfaktor ASF/SF2 (*alternative splicing factor/splicing factor2*) zeigt eine konzentrationsabhängige Auswahl der 5'-Spleißstelle in HeLa Kernextrakten [136]. Alle SR-Proteine besitzen am N-Terminus ein oder zwei RNA-Erkennungsmotive (RRM) und eine Serin/Argenin-reiche SR-Domäne am C-Terminus. Das SR-Motiv ist jedoch nicht alleiniges Erkennungsmerkmal der SR-Proteine, sondern tritt auch bei SR-ähnlichen Proteinen, hnRNPs, snRNPs und SR-Proteinkinasen auf, sodass man heute davon ausgeht, dass diese Domäne charakteristisch für Proteine ist, die an der prä-mRNA Prozessierung beteiligt sind. Über die SR-Domäne sind Protein-Protein-Wechselwirkungen möglich, die sowohl für die Formierung des Spleißapparates wie auch für das Paaren der Spleißstellen essentiell sind [113;137;138]. Des Weiteren sind sie sowohl für Bindungen an die RNA wie auch für die nukleäre Lokalisation in den sog. *speckles* mitverantwortlich.

SR-Proteine und SR-ähnliche Proteine unterscheiden sich in ihrer Struktur nicht wesentlich, lassen sich aber aufgrund ihres abweichenden biochemischen Verhaltens bzw. ihrer Antikörperreaktivität voneinander abgrenzen [139]. Ebenso wie SR-Proteine [113;114] können SR-ähnliche Proteine [140;141] in Abhängigkeit von ihrer Konzentration die Auswahl von Spleißstellen direkt beeinflussen und die Wirkung anderer SR-Proteine antagonisieren [142]. Im Gegensatz zu ihnen fungieren sie jedoch nicht als essentielle Spleißfaktoren, sondern üben vielmehr eine regulatorische Funktion auf Spleißprozesse aus [143]. Für alle SR-Proteine und einige SR-ähnliche Proteine konnte eine Aktivierung von Spleißprozessen *in vitro* nachgewiesen werden [144].

Das Serin-reiche Motiv bietet einen Angriffspunkt für eine Vielzahl von SR-Protein-Kinasen, zu denen u.a. die Familie der CDC-ähnlichen Kinasen (Clk) zählt [145;146]. Durch Phosphorylierung ist über eine veränderte Proteinaktivität ein Einfluss auf das alternative Spleißen denkbar.

2.5.1 Tra2 und Htra2-β

Das SR-ähnliche Protein Transformer 2 (Tra2) wurde erstmals als wichtiger Bestandteil der geschlechtsdeterminierenden Kaskade in *Drosophila* beschrieben [147]. Zusammen mit dem für das Weibchen spezifischen Protein Transformer (Tra) reguliert es das alternativ gespleißte dsx Exon 4, dessen Einschluss u.a. im Phänotyp des Weibchens resultiert [148;149]. Die bekannten menschlichen Homologe Htra2-α und Htra2-β [150;151] sind sowohl strukturell wie auch funktionell ähnlich. Beide Vollständigkeitsproteine besitzen eine zentrale RNA-Bindungsdomäne, die von zwei SR-Motiven flankiert wird, beide sind an der Regulation von Spleißprozessen beteiligt.

Das Htra2-β-Gen liegt auf Chromosom 3q26.2-q27, besteht aus 9 Introns und 10 Exons, von denen zwei alternativ gespleißt werden. Die erste SR-Domäne wird durch die Exons 3 und 4 kodiert, die zweite durch die Exons 7 und 9 und die RRM-Domäne durch die Exons 5 und 6 [152].

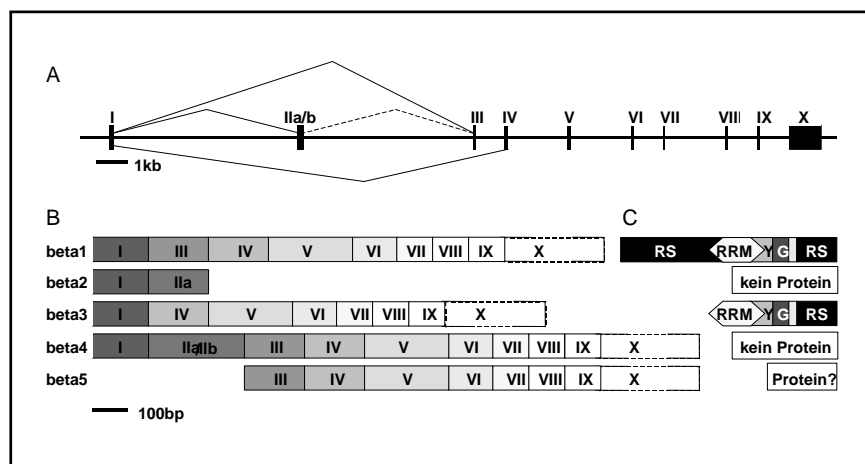


Abb. 13: Genstruktur und Isoformen von Htra2-β

- A** Genstruktur; die Exon (schwarze Rechtecke)- Intron – Struktur ist maßstabsgetreu wiedergegeben. Alternative Spleißmuster sind angedeutet.
- B** Mögliche mRNA-Transkripte; Rechtecke symbolisieren verwendete Exons.
- C** Proteinstruktur; **RS** SR-Domäne, **RRM** RNA-Erkennungsmotiv, **Y** tyrosinreiche Region, **G** glycinreiche Region.

Aufgrund alternativer Spleißvorgänge, Verwendung alternativer Promotoren und Polyadenylierungsstellen sind auf mRNA-Ebene insgesamt fünf Isoformen bekannt, von denen bis heute allerdings nur zwei (htra2-β1 und htra2-β3) auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten. Aufgrund eines Stopkodons in Exon 2 werden weder htra2-β2 noch htra2-β4 translatiert. Auch für htra2-β5 konnte noch kein Protein detektiert werden (Abb. 13).

Htra2- β 1 stellt die Volllängen-Isoform dar, die außer den Exons IIa und IIb alle Exons aufweist. In verschiedenen Transfektionsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass hTRA2- β 1 nicht nur das alternative Spleißmuster anderer Proteine wie beispielsweise des Amyloid-Precursor-Proteins [153] beeinflusst, sondern über eine Autoregulationsschleife auch Einfluss auf die eigene Konzentration nehmen kann (Abb. 14) [1;154]. Mittels Bindung an vier exonische Enhancersequenzen in Exon 2 des Htra2- β -Gens bewirkt sie den vermehrten Einschluss dieses Exons. Durch Einspleißen von Exon 2 wird ein Stopkodon eingeführt, infolgedessen die trunkierte, inaktive Isoform htra2- β 2 verstärkt gebildet wird. Phosphorylierung des hTRA2- β 1-Proteins führt zu einer stark reduzierten Bindungskapazität an Exon 2, wodurch wiederum die Entstehung von htra2- β 2 unterbunden wird und die Isoform htra2- β 1 verstärkt exprimiert wird. Dies veranschaulicht, wie die Zelle über eine Autoregulationsschleife die Konzentration des hTRA2- β 1-Proteins konstant halten kann,

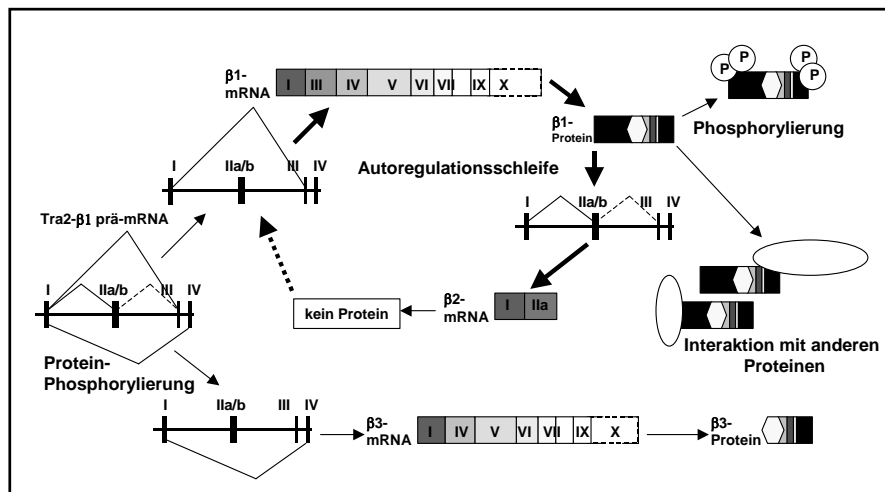


Abb. 14: Regulation des alternativen Spleißens des Htra2- β Gens (nach [6])

Das menschliche hTRA2- β -Protein verwendet eine Autoregulationsschleife um den eigenen Proteinlevel zu kontrollieren. Es bindet an vier regulatorische Motive in Exon 2 und induziert somit dessen Einschluss. Durch Einführung eines Stopkodons führt dieses Exon zu einer Unterbrechung des Leserasters, die entsprechende mRNA wird nicht translatiert.

selbst wenn die mRNA-Menge um ein Vielfaches ansteigt. Ein exakt kontrolliertes Verhältnis scheint für normale zelluläre Abläufe von größter Bedeutung zu sein. Matsuo [155], Segade [156] und Tsukamoto [157] konnten unter pathophysiologischen Bedingungen demonstrieren, dass eine veränderte Konzentration von hTRA2- β 1 in einer veränderten Spleißstellenauswahl resultiert.

Durch einen noch ungeklärten Mechanismus verhindert Proteinphosphorylierung (u.a. durch CLK2) den Einschluss von Exon 2 und 3, was zur Synthese des trunkierten Proteins hTRA2- β 3 führt. hTRA2- β 3 unterscheidet sich von hTRA2- β 1 durch das Fehlen der ersten RS-

Domäne. Im Gegensatz zur Vollformenform kann die verkürzte Isoform dadurch entsprechende alternative Spleißstellen nicht erkennen [158].

Durch Phosphorylierung mittels Clk-Kinasen (v.a. Clk2) kann der Einschluss von Exon 2 (in höheren Konzentrationen auch Exon 3) unterdrückt werden, es kommt zur verstärkten Expression der hirnspezifischen Isoform Htra2-β3 [145]. Neuronale Stimulation und hypoxische Verhältnisse führen im Kortex der Ratte zu einer Induktion der Htra2-β3 Expression, wohingegen die Htra2-β1 Isoform davon unberührt bleibt.

2.6 Clk-Kinasen

Proteinkinasen verschiedener Untergruppen besitzen die Fähigkeit unter *in vitro* Bedingungen Substrate phosphorylieren zu können. Einen Einfluss auf SR-Proteinaktivität und Spleißvorgänge *in vitro* wie auch *in vivo* konnte bis heute allerdings nur bei einer Untergruppe, den sog. LAMMER-Kinasen, festgestellt werden. Der Name LAMMER-Kinase beruht auf dem allen Familienmitgliedern eigenen fast zu 100% übereinstimmenden LAMMER-Motiv (Aminosäuresequenz EHLAMMERILG). Es ist Bestandteil des hoch konservierten katalytischen Zentrums, das für Phosphotransfer und Substratinteraktion essentiell ist. Bei den zwei bekannten Vertretern dieser Familie handelt es sich zum einen um die **SR-Protein** spezifischen **Kinasen** (SRPK), zum anderen um die **CDC2-ähnlichen/like Kinasen** (Clk). Beide Proteinfamilien zeigen unterschiedliche Substratspezifität [159] und subzelluläre Lokalisation. SRPK treten sowohl im Zellkern wie auch im Zytoplasma auf [146;160],

Tab. 2: Lokalisation der Clk-Gene

Gen	Chromosomale Lokalisation
Clk1	2q33
Clk2	1q21
Clk3	15q24
Clk4	5q35

wohingegen Clk nur im Zellkern [146] vorzufinden ist. Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass Phosphorylierungsvorgänge in Säugerzellen zeitlich wie auch räumlich koordinierten Regulationen unterliegen.

Clk-Kinasen lassen sich entsprechend der Aminosäure, die ihnen als Phosphat-Akzeptor dient, in Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen unterteilen. Alle Clks besitzen einen hoch konservierten Serinrest (Ser141), der eine Autophosphorylierungsstelle darstellt und über den es dem Enzym möglich ist, die eigene Konzentration und Lokalisation zu regulieren [161]. Im menschlichen Organismus konnten bis jetzt vier Clk-Kinasen (Clk1-4) identifiziert werden (Tab. 2) [162], die zwar ubiquitär, aber dennoch zellspezifisch in unterschiedlichem Ausmaß

exprimiert werden [145]. Bedingt durch alternatives Spleißen kann neben der jeweils aktiven Volllängenform eine trunkierte, inaktive Isoform generiert werden, der die carboxyterminale Kinasedomäne fehlt [162]. Diese akkumuliert in den *speckles*, während die aktive Isoform diffus im Nukleus verteilt ist. Alle aktiven Mitglieder dieser Familie können *in vitro* und *in vivo* SR-Proteine phosphorylieren [145;146;163]. Hieraus ergibt sich ihre Fähigkeit modulierend auf die Regulation der prä-mRNA Prozessierung einzuwirken. Zum einen können durch Phosphorylierung SR-Proteine aus ihren Speicherkompartimenten freigesetzt werden, wodurch sie für Reaktionen zur Verfügung stehen. Zum anderen konnten *in vitro* Studien bereits zeigen, dass sowohl Hypo- wie auch Hyperphosphorylierung von SR-Proteinen eine Inhibierung von Spleißprozessen bewirken können [164].

2.6.1 CDC-ähnliche Kinase 2 (Clk2)

Clk2 ist im humanen Genom auf Chromosom 1q21 kodiert und besteht aus 13 Exons und 12 Introns. Wie auch bei den anderen Mitgliedern der Clk-Familie können aufgrund alternativer Spleißprozesse zwei Isoformen generiert werden, die sich durch eine 88bp lange Insertion unterscheiden. Die längere Variante mit eingeschlossenem Exon 4 kodiert für ein Protein, das aus 499 Aminosäuren besteht. Es umschließt eine nicht-konservierte N-terminale RS-Domäne, eine hochkonservierte C-terminale Kinasedomäne und eine Vielzahl potentieller Phosphorylierungsstellen. Dieses Protein stellt die aktive Form der Clk2 (Clk2 +Exon 4) dar. Der inaktiven, kürzeren Isoform fehlt Exon 4, wodurch es zu einer Leserasterverschiebung kommt, die die Einführung eines Stoppkodons bewirkt. Es entsteht ein inaktives Protein ohne Kinasedomäne (Clk2 –Exon 4).

Alle vier Clk-Kinasen sind in Zellkulturexperimenten in der Lage alternative Spleißprozesse zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass sie den Ausschluss von Tau Exon 10 verstärken, wobei unter identischen Versuchsbedingungen Clk2 den vergleichsweise stärksten Effekt aufwies. Dies könnte auf eine unterschiedliche Substratspezifität innerhalb dieser Familie hinweisen. Ebenso kann durch Überexpression von Clk2 der Einschluss der Htra2-β Exons 2 und 3 unterdrückt werden [158].

2.7 Zielsetzung

Die Alzheimer-Erkrankung stellt mit einer Prävalenz von ca. 10% bei 65jährigen Menschen in den Industrieländern mittlerweile die vierthäufigste Todesursache dar. Abgesehen von den starken physischen und psychischen Belastungen für die Betroffenen und deren Angehörige, bedeutet diese Erkrankung auch gesundheitsökonomisch eine Herausforderung.

Ziel dieser Arbeit ist es einen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen zu leisten, die an der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung beteiligt sein könnten. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob Erkenntnisse, die in den letzten Jahren auf dem Sektor der alternativen Spleißvorgänge gewonnen wurden, auch Relevanz für die Alzheimer-Erkrankung besitzen. Verschiedene Forschergruppen konnten zeigen, dass für bestimmte Mutationen bei FTDP-17, die ebenso wie die Alzheimer-Erkrankung zu den Tauopathien zählt, eine Fehlregulation des alternativen Spleißens des Tau-Gens in ursächlichem Zusammenhang mit der Erkrankung steht. Das resultierende Missverhältnis der Tau-Isoformen scheint die charakteristischen Ablagerungen in AD-Gehirnen zu begünstigen. Des Weiteren konnte in verschiedenen *in vitro*- und Zellkulturexperimenten aufgezeigt werden, dass sowohl Htra2- β wie auch Clk2 maßgeblich am Regulationsmechanismus des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 beteiligt zu sein scheinen. Basierend hierauf wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung eine Fehlregulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 oder der an der Regulation beteiligten Faktoren Htra2- β und Clk2 mitverantwortlich sein könnte.

Mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene bzw. Western Blot auf Proteinebene sollte nun untersucht werden, ob sich eine derartige Fehlregulation *post mortem* nachweisen lässt.

Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zum besseren Verständnis molekularer Regelkreisläufe geleistet werden, die neue Ansätze für die Entwicklung einer Früherkennungsdiagnostik und Therapie der Alzheimer-Erkrankung möglich machen könnte.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Tab. 3: Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophorese-System (Typ Wide Mini Sub Cell GT)	BioRad
Aufbewahrungskassette (Filmentwicklung)	Rego
Aufziehhilfe, elektrische (accu-jet)	Brand
Eagle Eye	Stratagene
Heizblock (Unitek HB-130)	UniEquip
Hitzesterilisator (Heraeus)	Kendro
Meßzylinder	Schott
Mikrowelle (Privileg 9024E)	Quelle
Milli-Q plus Wasseraufbereitungsanlage	Millipore
Mini Protean II, Polyacrylamid Gelkammersystem, Blotting System	BioRad
PCR-Machine (Mastercycler gradient, Mastercycler)	Eppendorf
pH-Meter (pH 537)	WTW
Photometer (Genequant)	Pharmacia
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reinstwasseranlage	Millipore
Skalpelle	PFM
Spannungsquellen (Power Pac 300)	BioRad
Tiefkühlschrank (Economic, –20 °C)	Bosch
Ultra-Tiefkühlschrank (–80 °C)	New Brunswick Scientific
Unterlage, sterile	Sengewald
Vortex (Reax top)	Heidolph

Gerät	Hersteller
<u>Waagen:</u> Explorer PRECISA 1620 C	Ohaus Corporation Precisa
X-omat 1000 Prozessor	Kodak
Zentrifuge (Centrifuge 5415 C)	Eppendorf

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tab. 4: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Reagenz	Hersteller
Acrylamid/bis-Acrylamid (30% Konzentrat)	Sigma
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ammoniumsulfat	Roth
Bromphenolblau	Merck
Borsäure	Roth
dNTP (10mM)	Amersham
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
1,4-Dithiothreitol (DTT; Subst.)	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT; 0,1M)	Life Technologies
Einmalpipetten, steril	TPP
Ethanol (> 99,8%)	Roth
Ethidiumbromid (10mg/ml)	BioRad
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Roth/Merck
First Strand Buffer (5x)	Life Technologies
Fuji Medical X-Ray Film, Super RX	Fuji
Gelatine	Sigma
Gene Ruler 100bp (0,5mg DNA/ml) Stammlösung	Fermentas
Glycerol 87%	Sigma
4-Iodophenol (p-p-p-Iodophenol)	Aldrich
Isopropanol (> 99,7%)	Roth

Reagenz	Hersteller
p-p-Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedion)	Sigma
Magnesiumchlorid-Lsg. (25mM)	Fermentas
β -Mercaptoethanol	BioRad/Merck
MultiMark Multi-Colored Standard	Invitrogen
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS), ultra pure	Roth
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher und Schuell
Oligo(dT) (12–18 Primer 0,5 μ g/ μ l)	Amersham
Plastikfolie	Dow
RNase-Inhibitor (40u/ μ l)	Fermentas
RNeasy Mini-Kit (250)	Qiagen
RNeasy Shredder	Qiagen
Salzsäure, konz. (min. 32%)	Merck
SuperScript™ II (200u/ μ l)	Life Technologies
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (recombinant, 1u/ μ l)	Fermentas
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan)	Roth/Aldrich
Tris-Hydrochlorid	Roth
Triton X-100	Serva
Wasserstoffperoxid (30% Konzentrat)	Merck
Whatman Papier (Gel-Blotting-Papier)	Roth

3.1.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tab. 5: Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Ammoniumpersulfat-Lösung 10%	1g auf 10ml	Ammoniumpersulfat Wasser (Millipore)
ECL1 (4,4mM Luminol, 4,3mM Iodophenol)	880µl 537µl 5ml auf 50ml	p-p-Luminol (250mM Stammlsg.) p-p-p-Iodophenol (400mM Stammlsg.) 1M Tris-HCl pH 9,35– <u>9,5</u> Wasser (Millipore)
ECL2 (0,003% H ₂ O ₂)	5µl 5ml auf 50ml	Wasserstoffperoxid (30%) 1M Tris-HCl pH 9,35– <u>9,5</u> Wasser (Millipore)
Ethanol 70%	70g auf 100g	Ethanol (> 99,8%) Wasser (vollentsalzt)
Gene-Ruler 100bp-Verdünnung	100µl 166µl 734µl	Gene-Ruler Stammlösung 6x Loading Dye Wasser
p-p-p-Iodophenol 400mM (Stammlösung)	880,04mg auf 10ml	Iodophenol DMSO
Loading Dye	3ml 3ml 100µl 3,9ml	Bromphenolblau Lösung 1% Glycerol Lösung 30% EDTA-Lösung (0,5M) Wasser (vollentsalzt)
p-p-Luminol 250mM (Stammlösung)	443mg auf 10ml	Luminol DMSO
10x NET	438,5g 93,1g 303g 25ml	Natriumchlorid EDTA Tris-Base Triton X-100

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
1x NET Gelatine	12,5g	Gelatine (in Wasser aufgekocht)
	500ml	10x NET
	auf 5 l	Wasser (Millipore)
10x PCR Puffer: pH 9,0 / pH 9,5 / pH 10,0 (600mM Tris, 150mM (NH ₄) ₂ SO ₄)	14,54g	Tris-Base
	3,96g	Ammoniumsulfat
	auf 200ml	Wasser (vollentsalzt)
		Einstellung auf entspr. pH-Wert (1N-NaOH/1N-HCl), sterilfiltrieren
5x PCR-Puffer G (12,5mM MgCl ₂ , 300mM Tris, 75mM (NH ₄) ₂ SO ₄)	500µl	MgCl ₂ (25mM-Lsg.)
	500µl	10x Puffer pH 9,0
5x PCR-Puffer K (12,5mM MgCl ₂ , 300mM Tris, 75mM (NH ₄) ₂ SO ₄)	500µl	MgCl ₂ (25mM-Lsg.)
	500µl	10x Puffer pH 9,5
5x PCR-Puffer O (12,5mM MgCl ₂ , 300mM Tris, 75mM (NH ₄) ₂ SO ₄)	500µl	MgCl ₂ (25mM-Lsg.)
	500µl	10x Puffer pH 10,0
1x Protein Puffer (Laufpuffer)	1:10 Verdünnung des 10x Running Buffers Einstellung auf pH 8,3	
1x Protein Transfer Puffer (Blot)	15g	Tris-Base
	72,5g	Glycin
	auf 1 l	Wasser (vollentsalzt)
10x Running Buffer	10g	SDS
	143,3g	Glycin
	30,25g	Tris-Base
	auf 1 l	Wasser (vollentsalzt)
Sample buffer	600µl	1M Tris-Lsg. pH 6,8
	1ml	SDS-Lsg. 20%
	0,15g	DTT
	auf 10ml	Wasser (Millipore)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
Sammelgel (4,0%ig; 0,125 M Tris pH 6,8)	6,1ml	Wasser (demineralisiert)
	2,5ml	0,5M Tris-HCl pH 6,8
	100µl	SDS-Lösung 10% (m/V)
	1,3ml	Acrylamid/bis-Acrylamid (30% Konz.)
	75µl	Ammoniumpersulfat-Lösung 10%
	10µl	TEMED
3x SDS Gelladepuffer (150mM Tris pH 6,8; 6% SDS; 30% Glycerol; 3% β-Mercaptoethanol)	15ml	1,5mM Tris pH 6,8
	15ml	SDS 20%
	0,1ml	Bromphenolblau
	17,3ml	Glycerol 87% β-Mercaptoethanol → nur auf kleineres Aliquot zufügen (bei 1ml: 30µl β-ME)
SDS-Lösung 10% (m/V)	10g	SDS-Base
	auf 100ml	Wasser (Millipore)
SDS-Lösung 20% (m/V)	200g	SDS-Base
	auf 1 l	Wasser (Millipore) pH 7,2 (bereits nach Einwiegen)
5x TBE	54,0g	Tris-Base
	27,5g	Borsäure
	3,75g	EDTA Dinatriumsalzdihydrat
	auf 1 l	Wasser (vollentsalzt)
0,5x TBE	1:10 Verdünnung des 5x TBE Puffers	
Trenngel (12%ig; 0,375M Tris pH 8,8)	3,5ml	Wasser (demineralisiert)
	2,5ml	1,5M Tris-HCl pH 8,8
	100µl	SDS-Lösung 10% (m/V)
	4,0ml	Acrylamid/bis-Acrylamid (30% Konz.)
	75µl	Ammoniumpersulfat-Lösung 10%
	10µl	TEMED
0,5M Tris-HCl pH 6,8	60,57g	Tris-Base
	auf 1 l	Wasser (Millipore) mit konz. HCl auf pH 6,8 einstellen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1M Tris-HCl pH 6,8	121,14g Tris-Base auf 1 l Wasser (Millipore) mit konz. HCl auf pH 6,8 einstellen, sterilfiltrieren
1M Tris-HCl pH 9,5	121,1g Tris-Base auf 1 l Wasser (Millipore) mit konz. HCl auf pH 9,5 einstellen
1,5M Tris-HCl pH 8,8	181,71g Tris-Base auf 1 l Wasser (Millipore) mit konz. HCl auf pH 8,8 einstellen

3.1.4 Antikörper

Tab. 6: Antikörper

Antikörper	Charakterisierung	Hersteller	Verdünnung
ps568/tra	primärer AK Antigenspezifität: tra2-beta und -alpha (erfasst tra2-beta1 und 3) Peptid: GC(StBu)SITKRPHTPTPGIYMGRPTY	eigen	1:1000
Anti-Actin	primärer Antikörper	Sigma	1:200
Anti-rabbit Ig	sekundärer AK HRP-Linked F(ab1)2 Fragment	Amersham	1:1000 bzw. 1:2500

3.1.5 Oligonukleotide

Tab. 7: Oligonukleotide

Name	O	Sequenz	Lokalisation	Länge	Verwendung
HT9SMS	f	gggagcccaagaaggtggcagtgg	Tau Exon 9	24	Tau/PCR
HT11N	r	atgtgcctaataagccacacttg	Tau Exon 11	24	Tau/PCR
ex9tau	f	agtcgccgtcttcgccaagagccg	Tau Exon 9	25	Tau/PCR
ex13tau	r	ttctcgcggaaggtcagcttgagg	Tau Exon 13	25	Tau/RT
da9f	f	aagatcggtccactgagaa	Tau Exon 9	20	Tau/PCR
da12r	r	gtgggtgatattgtccagg	Tau Exon 12	20	Tau/PCR
tau13d	r	ggcgggtcattattcttt	Tau Exon 13	20	Tau/PCR
taun9f	f	caagatcggtccactgagaa	Tau Exon 9	21	Tau/PCR
taun13r	r	ggcgagtctaccatgtcgat	Tau Exon 13	20	Tau/PCR
taunrt13	r	gaggcagacacctcgtag	Tau Exon 13	19	Tau/RT
fbclRT1	r	atgatcttcagggaactcg	Clk Exon 6	20	Clk/RT
fbclkf2	f	aatatcagcgggagaacagc	Clk Exon 3	20	Clk/PCR
fbclkr1	r	gtcccctctcctaaggtgct	Clk Exon 5	20	Clk/PCR
fbtraf1	f	aaggaaggtgcaagaggttg	Htra Exon 1	20	Htra/PCR
fbtrar1	r	cggcaatgggacatatatta	Htra Exon 4	20	Htra/PCR

O Orientierung, f forward, r reverse

Alle aufgelisteten Oligonukleotide sind in 5'-3'-Richtung angegeben und wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

3.1.6 Hirngewebe

Das verwendete Hirngewebe umfasst tiefgefrorene Gewebestücke aus zwei Gruppen. Die eine wurde uns in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. H. Hampel, Psychiatrie, LMU München zur Verfügung gestellt und kommt von der Kathleen Price Bryan Brain Bank, Durham, USA. Es handelt sich hierbei um 15 Alzheimer-Patienten und 9 Kontrollen (Tab. 10 und Tab. 11). Die andere entstammt der Kollaboration mit Prof. Dr. P. Riederer, Psychiatrie, Universitätsklinikum Würzburg und besteht aus 7 Demenz Gehirnen sowie 8 Kontrollen (Tab. 8 und Tab. 9). Alle Gehirne wurden *post mortem* basierend auf der Einteilung nach Braak und Braak neuropathologisch klassifiziert.

Das untersuchte Hirngewebe umschließt insgesamt vier Regionen. Der Präfrontal- und Temporalkortex stellen Hirnareale dar, die bereits im Frühstadium der Alzheimer-Erkrankung von Taupathologie betroffen sind. Der okzipitale wie auch der supplementäre Motokortex, die nicht oder erst sehr spät die spezifischen hirmorphologischen Veränderungen der AD aufzeigen, dienten als Kontrollregionen.

3.1.6.1 Hirngewebe Würzburg

Die untersuchten Gehirne der beiden Gruppen unterschieden sich bezüglich ihres Alters ($p = 0,028$; $T = -2,577$; $df = 10$), weisen aber keine Unterschiede bei Geschlecht ($p = 0,530$) und *post mortem* Zeit ($p = 0,375$; $T = 0,925$; $df = 11$) auf. Aus dieser Hirnreihe wurde der supplementäre Motokortex untersucht.

Tab. 8: Kontroll-Gehirne

Sek.-Nr.	Nr.	Alter [a]	Geschlecht	pmz [h]	<i>post mortem</i> Diagnose
30/688/94	1	68	w	13:00	altersgemäß
30/222/95	2	76	m	18:05	altersgemäß
09/67/95	3	64	w	13:55	altersgemäß
09/28/98	4	84	m	16:30	keine Taupathologie
30/276/94	5	63	m	10:30	altersgemäß
30/607/94	6	88	w	15:00	altersgemäß
09/29/97	7	71	w	11:00	altersgemäß
13/14/96	8	74	w	<12:00	keine Taupathologie

Sek.-Nr. Sektionsnummer der Hirnbank, **Nr.** interner Nummernschlüssel, **w** weiblich, **m** männlich, **pmz** *post mortem* Zeit, **AD** Alzheimer-Erkrankung

Tab. 9: Alzheimer-Gehirne

Sek.-Nr.	Nr.	Alter [a]	Geschlecht	pmz [h]	<i>post mortem</i> Diagnose
33/17/96	9	84	w	<20:00	Braak III - VI
09/264/97	10	83	w	19:30	AD-Pathologie
33/300/95	11	89	m	02:00	Braak IV - V
13/009/94	12	90	w	08:00	AD-Pathologie
13/12/96	13	81	m	13:40	Braak VI
09/54/98	14	76	w	09:00	Braak V
33/379/94	15	76	w	17:00	Braak IV - V

Sek.-Nr. Sektionsnummer der Hirnbank, **Nr.** interner Nummernschlüssel, **w** weiblich, **m** männlich, **pmz** *post mortem* Zeit, **AD** Alzheimer-Erkrankung

3.1.6.2 Gehirne der Kathleen Price Bryan Hirnbank

Die Gehirne dieser Reihe unterschieden sich weder in Alter ($p = 0,464$; $T = 0,421$; $df = 22$), Geschlecht ($p = 0,831$) noch *post mortem* Zeit ($p = 0,292$; $T = -1,081$; $df = 21$) voneinander. Die untersuchten Hirnregionen umfassen den Präfrontal- und Temporalkortex sowie den okzipitalen Kortex.

Tab. 10: Kontroll-Gehirne

Sek.-Nr.	Nr.	Alter [a]	Geschlecht	pmz [h]	<i>post mortem</i> Diagnose
99	17	85	m	2:00	keine Taupathologie
113	18	73	w	0:30	keine Taupathologie
518	21	81	m	10:30	Braak I - II
542	22	82	m	3:15	keine Taupathologie
543	23	72	w	3:00	keine Taupathologie
621	24	92	w	2:35	keine Taupathologie
673	25	80	w	1:10	keine Taupathologie
790	27	78	w	2:22	keine Taupathologie
838	29	91	m	7:40	Braak I

Sek.-Nr. Sektionsnummer der Hirnbank, **Nr.** interner Nummernschlüssel, **w** weiblich, **m** männlich, **pmz** *post mortem* Zeit

Tab. 11: Alzheimer-Gehirne

Sek.-Nr.	Nr.	Alter [a]	Geschlecht	pmz [h]	<i>post mortem</i> Diagnose
539	1	91	w	6:00	AD
589	2	90	w	2:20	Braak V
611	3	81	w	3:00	AD
721	4	64	w	3:36	Braak V
759	5	100	w	5:50	Braak IV
760	6	77	w	4:00	Braak III
764	7	83	m	1:15	Braak IV
765	8	62	m	1:30	Braak V
766	9	77	w	4:05	Braak V
777	10	74	m	1:10	Braak IV
781	11	79	w	3:45	Braak V
803	12	72	m	3:30	Braak IV
857	13	85	w	2:45	Braak V
863	14	83	m	2:00	Braak V
873	15	79	m	2:00	Braak IV

Sek.-Nr. Sektionsnummer der Hirnbank, **Nr.** interner Nummernschlüssel, **w** weiblich, **m** männlich, **pmz** *post mortem* Zeit, **AD** Alzheimer-Erkrankung

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation des Gewebes

Während der Präparation der Gewebeproben wurde stets auf Trockeneis gearbeitet. Sterile Unterlagen, Handschuhe und Skalpelle verhinderten RNase-Kontamination. Das gefrorene Gewebe wurde soweit angetaut, dass es gut zu schneiden, aber dennoch nicht vollständig aufgetaut war. Es wurden jeweils 20–30mg Hirngewebe abgewogen und in sterilen 1,5ml Eppendorf-Gefäßen sofort wieder auf Trockeneis gestellt.

3.2.2 RNA-Extraktion

Die Technologie der RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit[®] basiert auf den selektiven Bindungseigenschaften von Silica-Gel Membranen. Ein spezielles Puffersystem bewirkt die Bindung von bis zu 100µg RNA (länger als 200bp) an dieser Membran. Die Denaturierung aller Proteine einschließlich der RNasen erfolgt durch einen Guadinium-Isothiocyanathaltigen Puffer in Verbindung mit β -Mercaptoethanol. Durch die Inaktivierung der RNasen wird deren Interaktion mit der RNA verhindert. Ethanol schafft adäquate Bindungsverhältnisse, sodass die RNA vollständig an die Membran binden kann und so eine effiziente Reinigung möglich ist (Qiagen, RNeasy Mini Kit, Handbook).

Die zur RNA-Extraktion verwendeten Puffer RLT, RW1 und RPE der Firma Qiagen sind durch diese nicht näher spezifiziert.

3.2.2.1 Homogenisieren der Gewebeproben

Nach Zugabe von 600µl RLT Puffer (versetzt mit 10µl/ml β -Mercaptoethanol) wurde das Gewebe mit einer sterilen Spritze und Kanüle durch mehrmaliges Aufziehen grob homogenisiert, die Suspension auf eine QIAshredder spin Säule (1. selektive Membran) gegeben und durch Zentrifugieren (2min bei maximaler Geschwindigkeit) vollständig homogenisiert. In frische 2ml Sammelgefäße wurden 600µl Ethanol vorgelegt, in den das gewonnene Lysat vollständig überführt wurde. Das entstandene Pellet blieb zurück. Dieser Vorgang bewirkte das vollständige Ausfällen der RNA.

3.2.2.2 Bindung der RNA

2 x 600µl der Probe wurden nacheinander auf eine RNeasy mini Säule (2. selektive Silica-Gel Membran) gegeben und je 15s bei 10.000rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

3.2.2.3 Reinigen und Trocknen der RNA

700µl RW1 Puffer wurde auf die Membran pipettiert und zentrifugiert (15s/10.000rpm), das Eluat verworfen. Nach Aufsetzen der Säule auf neue 2ml Sammelgefäße wurde mit 500µl RPE Puffer gewaschen und zentrifugiert (15s/10.000rpm). Das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden nochmals 500µl RPE Puffer zugegeben und zentrifugiert (2min bei maximaler Geschwindigkeit). Dieser Schritt diente der Trocknung der Membran, um beim Eluieren der RNA Verunreinigungen durch Pufferreste zu vermeiden. Das Eluat wurde wiederum verworfen.

3.2.2.4 Eluieren der RNA

Die Säulen wurden auf 1,5ml Eppendorf-Gefäße überführt, die Membran direkt mit 45µl RNase-freiem Wasser benetzt und 1min bei 10.000rpm zentrifugiert. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Lagerung der RNA bei –80 °C.

3.2.3 Photometrische Reinheits- und Ausbeutebestimmung der RNA

Nukleotide stellen substituierte Aromaten dar, die UV-Licht im Bereich zwischen 220–230nm absorbieren, wodurch UV-Absorptionsspektren zur qualitativen und quantitativen Bewertung von Nukleinsäurelösungen herangezogen werden können. Für Konzentrationsberechnungen dient das mittlere Absorptionsmaximum bei 260nm. Der Berechnung für RNA-Konzentrationen liegt folgende Gleichung zugrunde (40µg/ml = Faktor für RNA Berechnungen):

$$\text{Ribonukleinsäure: } c = A_{260\text{nm}} \times 40\mu\text{g/ml}$$

Da viele Substanzen mit konjugiertem Elektronensystem (z. B. aromatische Aminosäuren) im Bereich von 260 bis 280nm ebenfalls absorbieren, lässt sich über den Quotienten A_{260}/A_{280} ein Reinheitsfaktor bestimmen, der zwischen 1,7–2,1 liegen sollte.

Die Messungen wurden in einer Quarzglasküvette mit dem Photometer Genequant® der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt. Der Reinheitsgrad der untersuchten RNA-Lösungen

lag in der Regel bei 1,8–2, die erhaltenen mRNA-Konzentrationen der Eluate lagen zwischen 30 und 100 µg/ml. Zum Nullabgleich wurde destilliertes Wasser als Referenzlösung verwendet.

3.2.4 Primerdesign

Die verwendeten Primer wurden auf Grundlage der genomischen Sequenzen mit Hilfe der Internetseite des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ermittelt. Hierzu wurde über PubMed/Nucleotide und LocusLink (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/LocusLink/>) die entsprechende genomische Sequenz bzw. mRNA-Sequenz herausgesucht (Tau: NT_010783 bzw. NM_016835). In „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>) wurden die Primer und die zu amplifizierenden Sequenzen auf ihre Spezifität überprüft. Das Primerdesign wurde mit dem Programm „Primer3 Output“ im Internet vorgenommen (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Dieses Programm bestimmt selbstständig die günstigsten Primerkombinationen für eine bestimmte Sequenz. Die gewählten Primer besitzen eine Länge von 19–25 Nukleotiden, ihr G/C Gehalt beträgt 40–60% und die Schmelztemperatur der jeweiligen Primerpaare liegt in ähnlichen Bereichen. Um Primer-Dimere zu vermeiden wurden komplementäre Basensequenzen vermieden.

Eine Ausnahme stellen die Primerpaarungen HT9SMS/HT11N, die der Veröffentlichung von Gao et al. [140] entnommen wurde, und die Kombinationen für Clk2 bzw. Htra2-β dar, die der Diplomarbeit von F. Berendt [165] entstammen.

3.2.4.1 Oligonukleotide

Die Primer wurden lyophilisiert geliefert. Nach kurzem Zentrifugieren wurden sie in RNase freiem Wasser so gelöst, dass die Lösung eine Konzentration von 100 pmol/µl besaß. Aus dieser Stammlösung wurden durch eine 1:50 Verdünnung Primer-Lösungen mit einer Konzentration von 2 pmol/µl hergestellt und so im PCR-Ansatz eingesetzt.

3.2.4.2 Tau-Primer

Für die Amplifikation der Tau-Isoformen erzielte die Primerkombination taun9f/taun13r (Tab. 7, S. 39) die besten Ergebnisse. Die Primer liegen auf Exon 9 und 13, wodurch sich für Tau +Exon 10 ein 495bp langes Fragment ergibt. Tau –Exon 10 ist um 93bp kürzer und weist eine 402bp lange Sequenz auf.

3.2.4.3 Clk2-Primer

Die Primer für die Clk2-Sequenz liegen auf Exon 3 (fbclkf2) und 5 (fbclkf1) (Tab. 7, S. 39) und flankieren somit das 88bp lange alternative gespleißte Exon 4. Der spezifische Primer für die reverse Transkription liegt auf Exon 6 (fbclkRT1) (Tab. 7, S. 39). Mittels RT-PCR wurden zwei Fragmente amplifiziert, die je nach Ein- oder Ausschluss von Exon 4 eine Sequenz von 220bp bzw. 132bp aufweisen.

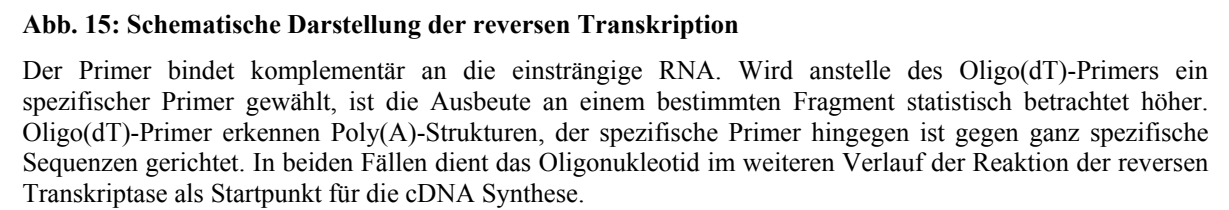
3.2.4.4 Htra2-β Primer

Durch ihre Lage auf Exon 1 und Exon 4 müssten mittels der Primerkombination fbtraf1/fbtrar1 drei der fünf Htra m-RNA Isoformen nachweisbar sein (Abb. 13, S. 27). Tatsächlich konnten wir unter diesen Bedingungen nur zwei Fragmente bestimmen, das 502bp lange Htra2-β1 (-Exon2) sowie das 368bp lange Htra2-β3 (-Exon 2/-Exon 3).

3.2.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) ist eine hoch empfindliche Methode, um die Genexpression auf RNA-Ebene zu untersuchen oder mRNA zu quantifizieren. Diese Methode macht die gleichzeitige Analyse einer großen Zahl an mRNAs möglich [166]. Mit Hilfe eines Oligo(dT)-Primers, der an die Poly(A)-Struktur am 3'-Ende der einzelsträngigen mRNA hybridisiert oder eines spezifischen Primers kann die reverse Transkriptase (SuperScript™ II) die komplementäre cDNA synthetisieren. Wird anstelle eines Oligo(dT)-Primers ein spezifischer Primer eingesetzt, werden statistisch mehr cDNA-Fragmente eines bestimmten Gens synthetisiert, was wiederum zur Erhöhung der Ausbeute führt (Abb. 15).

Die reverse Transkriptase ist ein genetisch manipuliertes Enzym, das aus bestimmten RNA-Tumroviren gewonnen wird. Bei diesem Enzym ist das RNase-H-aktive Zentrum durch eine Deletion so verändert, dass die RNase-H-Aktivität um den Faktor 10^6 – 10^7 reduziert ist, die Polymerase-Aktivität jedoch voll erhalten bleibt.



Der Primer bindet komplementär an die einsträngige RNA. Wird anstelle des Oligo(dT)-Primers ein spezifischer Primer gewählt, ist die Ausbeute an einem bestimmten Fragment statistisch betrachtet höher. Oligo(dT)-Primer erkennen Poly(A)-Strukturen, der spezifische Primer hingegen ist gegen ganz spezifische Sequenzen gerichtet. In beiden Fällen dient das Oligonukleotid im weiteren Verlauf der Reaktion der reversen Transkriptase als Startpunkt für die cDNA Synthese.

3.2.5.1 Reaktionsansatz der RT

In den nachfolgenden Tabellen sind die für die reverse Transkription eingesetzten Reagenzien und deren Volumina aufgeführt (Tab. 12 und Tab. 13). Die RNA wurde vorgelegt, anschließend je 11,5 µl des Mastermixes zugefügt. Pro Reaktionsansatz lief eine Negativkontrolle mit.

Tab. 12: RT-Ansatz Tau und Htra2-ß

Reagenzien	Volumen/Probe
vorgelegte RNA	10µl
5x First Strand Puffer	4µl
H ₂ O	1µl
DTT	2µl
dNTP	2,5µl
Oligo(dT)-Primer	1µl
RNase-Inhibitor	0,5µl
Superscript II	0,5µl
Volumen Reagenzien	11,5µl
Endvolumen	21,5µl

Tab. 13: RT-Ansatz Clk2

Reagenzien	Volumen/Probe
vorgelegte RNA	5µl
5x First Strand Puffer	2µl
DTT	1µl
dNTP	1,25µl
fbclkRT1	1,5µl
RNase-Inhibitor	0,25µl
Superscript II	0,25µl
Volumen Reagenzien	6,25µl
Endvolumen	11,25µl

3.2.5.2 Versuchsbedingungen

Alle verwendeten Reagenzien waren steril, die Versuche wurden in RNase-freien 0,5ml Gefäßen auf Eis angesetzt. Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte in einem Eppendorf Mastercycler, wobei eine Standardbedingung von 45min bei 42°C gewählt wurde. Auf eine abschließende 15 minütige Inaktivierung des Enzyms bei 70°C wurde allerdings verzichtet, da dies zu wesentlich schlechteren Ergebnissen führte. Die so erhaltene cDNA konnte entweder im direkten Anschluss an die reverse Transkription in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt oder aber bis zur weiteren Verwendung bei –80°C aufbewahrt werden.

3.2.6 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Mitte der 80er Jahre von Kary Mullis [167] entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) hat sich zu einer unentbehrlichen Methode der Molekularbiologie entwickelt, mit der sich auch geringste Mengen spezifischer DNA nachweisen lassen [168]. Heute bietet die PCR eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten, wie z.B. die Identifikation von Mutationen, die bei der Vererbung von Krankheiten eine Rolle spielen, oder den genetischen Fingerabdruck in der Medizin bzw. der forensischen Psychiatrie.

Das Reaktionsprinzip der PCR ähnelt der Replikation der DNA in der Zelle. Ausgehend von einer DNA-Matrize und einem spezifischen Primerpaar, das an den *sense*- bzw. *antisense*-Strang hybridisiert, wird die von den Primern flankierte Sequenz exponentiell amplifiziert.

Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Im ersten Schritt, der Denaturierung (ca. 94°C), wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Beim Annealing, dem zweiten Schritt (ca. 55°C), hybridisieren die Oligonukleotid-Primer mit den beiden Matrizensträngen und dienen der DNA-Polymerase im dritten Schritt, der Elongation (ca. 70°C), als Startmoleküle. Dieser Zyklus wird je nach Reaktion ca. 25–35 mal wiederholt. Während dieser Kettenreaktion wird das gewünschte DNA-Fragment millionenfach amplifiziert (Abb. 16).

Die *Taq*-DNA-Polymerase [168] stammt aus einem *Escherichia coli*-Stamm, der ein Plasmid mit dem klonierten Gen der *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase trägt. Diese hitzestabile DNA-Polymerase hat die PCR sehr vereinfacht und verbessert. Das Bakterium *Thermus aquaticus* lebt in heißen Quellen bei einer Wassertemperatur von 75°C. Seine DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) hat ein Temperaturoptimum von 72°C und ist selbst bei der Denaturierungstemperatur von ca. 94°C noch stabil.

Die PCR ist eine relativ empfindliche Methode, d. h. für eine optimale Reaktion müssen bestimmte Bedingungen eingehalten werden. So kann beispielsweise eine zu hohe Konzentration an *Taq*-Polymerase die Bildung von Nebenprodukten verstärken, da die Substratspezifität des Enzyms sinkt. Auch die Primerkonzentrationen müssen entsprechend gewählt werden. Zu hohe Konzentrationen können zur gegenseitigen Hybridisierung der Primer führen, zu niedrige wiederum unterbinden den reibungslosen Ablauf der Reaktion, da zu wenig Oligonukleotide für die nacheinander ablaufenden Zyklen zur Verfügung stehen.

Um eine optimale Ausbeute und eine stabile Reaktion zu ermöglichen, wurden die Parameter der PCR wie folgt optimiert.

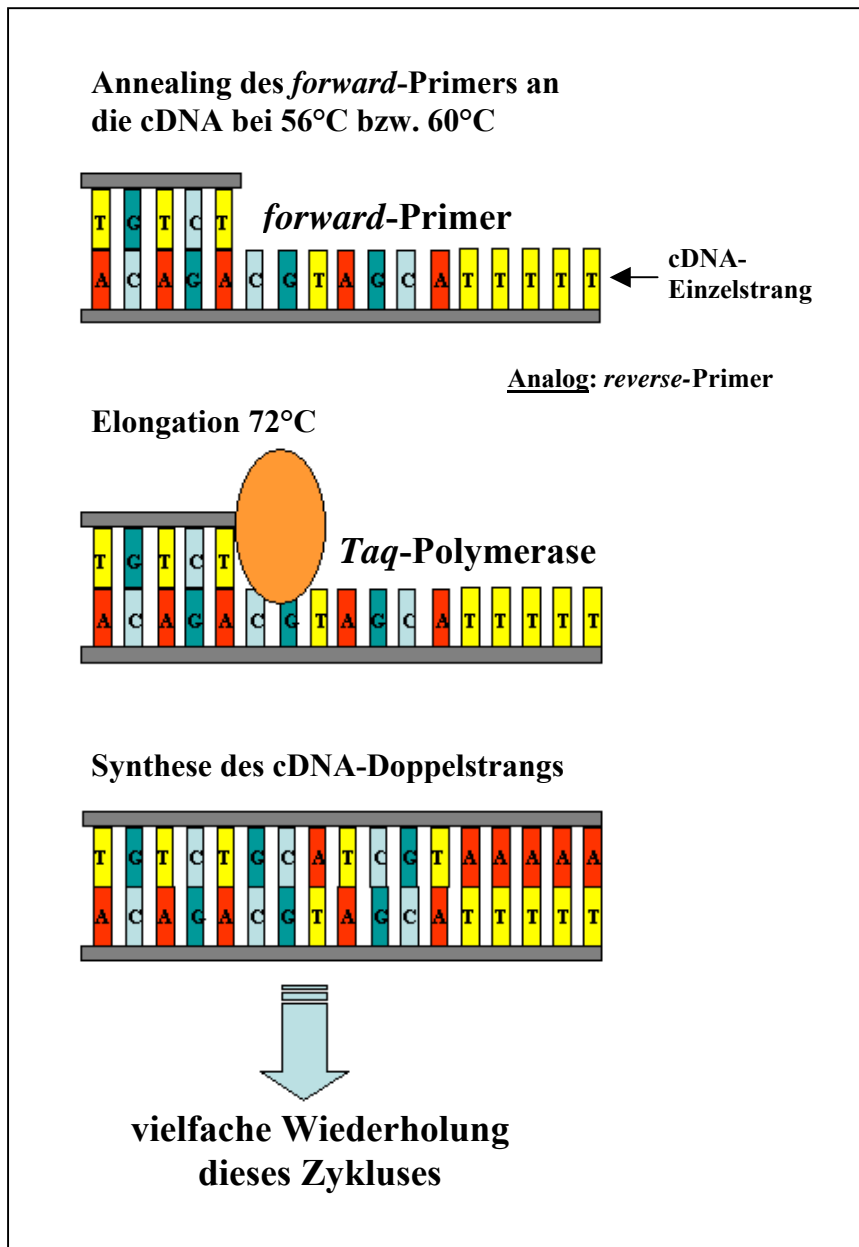


Abb. 16: Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion

Unter Verwendung spezifischer *forward*- und *reverse*-Primer ist es möglich einen Genabschnitt millionenfach zu vervielfältigen. Die initiale Denaturierung jedes Zyklus bewirkt die Trennung der Doppelstränge voneinander, sodass sie als Matrize für die Primer zur Verfügung stehen (Annealing). Diese Oligonukleotide stellen den Startpunkt für die *Taq*-Polymerase dar, die aus dem Einzel- einen komplementären Doppelstrang synthetisiert (Elongation). Dieser steht dann wiederum der Reaktion als Ausgangsprodukt zur Verfügung.

3.2.6.1 Puffer-Optimierung

3.2.6.1.1 Puffer-Optimierung *Tau*

Die Ermittlung des besten Puffers erfolgte über eine Testreihe mit Puffern unterschiedlicher MgCl_2 -Konzentration und pH-Werte. Die MgCl_2 -Konzentrationen variierten von 7,5mM bis 15mM, der pH-Wert von pH 8,5–pH 9,5 (Tab. 14 und Abb. 17). Für *Tau* stellte sich Puffer G mit einer MgCl_2 -Konzentration von 12,5mM und dem pH 9,0 als optimale Bedingung heraus.

Tab. 14: Puffer der Tau Pufferoptimierung

Die Puffer B–15 wurden in Anlehnung an das Optimized™ Buffer Kit-Protokoll der Firma Invitrogen hergestellt, die Puffer M0–M3 in Anlehnung an die 10x Pufferreihe mit (NH₄)₂SO₄ der Firma Fermentas.

Puffer	MgCl ₂ -Konzentration	pH-Wert
B	10,0mM	8,5
E	7,5mM	9,0
F	10,0mM	9,0
G	12,5mM	9,0
15	15,0mM	9,0
J	10,0mM	9,5
M0	12,5mM	8,5
M1	10,0mM	8,5
M2	8,75mM	8,5
M3	7,5mM	8,5

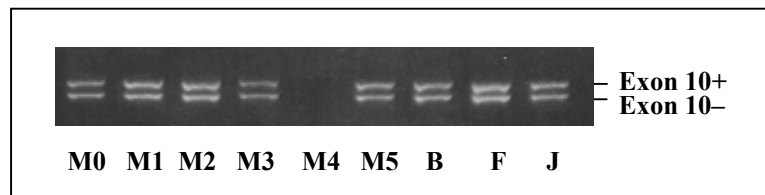


Abb. 17: Repräsentatives Agarosegel der Tau Pufferoptimierung

3.2.6.1.2 Puffer-Optimierung *Clk2* und *Htra2-β*

Die optimalen Puffer für *Clk2* (Puffer O) und *Htra2-β* (Puffer K) wurden der Diplomarbeit von F. Berendt [165] entnommen.

3.2.6.2 Annealing-Temperatur Tau

Hohe Annealing-Temperaturen führen zu einer sehr spezifischen Amplifikation, während niedrigere Temperaturen die Ausbeute steigern. Die günstigste Annealing-Temperatur wurde mit Hilfe eines über dem Heizblock programmierten Temperaturgradienten ermittelt. Die Temperatur stieg über dem Heizblock konstant von 55,0°C bis auf 61,0°C an. Hieraus ergab sich für die Durchführung der Tau-PCR eine konstante Annealing-Temperatur von 56,0°C (Abb. 18).

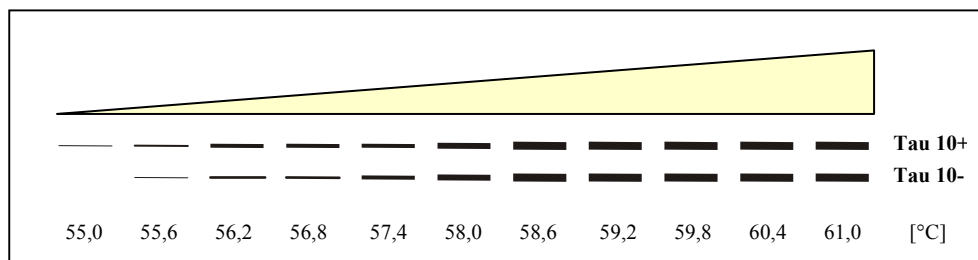


Abb. 18: Schematische Darstellung der Tau-Banden bei entsprechenden Temperaturen

Unterhalb 55,6°C war die Intensität zu schwach, ab einer Temperatur von 57,4°C konnten keine Intensitätsunterschiede der Banden mehr festgestellt werden. Es wurde eine konstante Annealing-Temperatur von 56,0°C gewählt.

3.2.6.3 Annealing-Temperatur Clk2 und Htra2-β

Die optimale Annealingtemperatur für Clk2 und Htra2-β liegt im *Touch-down*-Modus bei 60°C und im normalen PCR-Modus bei 56°C [165].

3.2.6.4 Zyklen-Optimierung für Tau

Die Anzahl der Amplifikate wächst exponentiell mit der Zyklenzahl. Werden zu wenig Zyklen eingestellt, ist die Ausbeute zu gering. Bei zu hoher Zyklenzahl wird eine Sättigung erreicht und relative Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Banden können nicht mehr erkannt werden. Um zu gewährleisten, dass das Verhältnis der unterschiedlichen Fragmente dem des Ausgangsmaterials entspricht, muss die Messung in der exponentiellen Phase liegen. Für diesen Optimierungsschritt werden einzelne Reaktionsansätze jeweils nach einer definierten Zyklenzahl aus dem Thermocycler entnommen.

Anhand des Agarosegels lassen sich die Intensitäten der Banden in Abhängigkeit von der Zyklenzahl in einer Kurve darstellen (Tab. 15 und Abb. 19). Die Intensitäten der Banden in Abhängigkeit von der Zyklenzahl werden bei konstanter Annealing-Temperatur durchgeführt. Eine Anzahl von 37 Zyklen mit konstanter Annealing-Temperatur von 56 °C hat sich für Tau als optimal herausgestellt.

Tab. 15: Intensitäten der Tau Gelbanden

Die Tabelle zeigt die mit der Software TotalLab gemessenen Intensitäten der einzelnen Banden. Die Intensität der Banden ist ab dem 28. Zyklus messbar und liegt ab dem 40. Zyklus außerhalb des exponentiellen Bereichs.

Zyklenzahl	28	30	32	35	36	38
Exon 10+	858,0	1705,5	3508,5	4266,0	2774,0	5947,0
Exon 10-	767,0	1685,5	3044,5	3634,0	2377,0	5909,0

Zyklenzahl	40	42	44	46	48
Exon 10+	7097,0	5914,0	5249	6178	6133
Exon 10-	7725,0	6800,0	4459,5	5444,0	6733,0

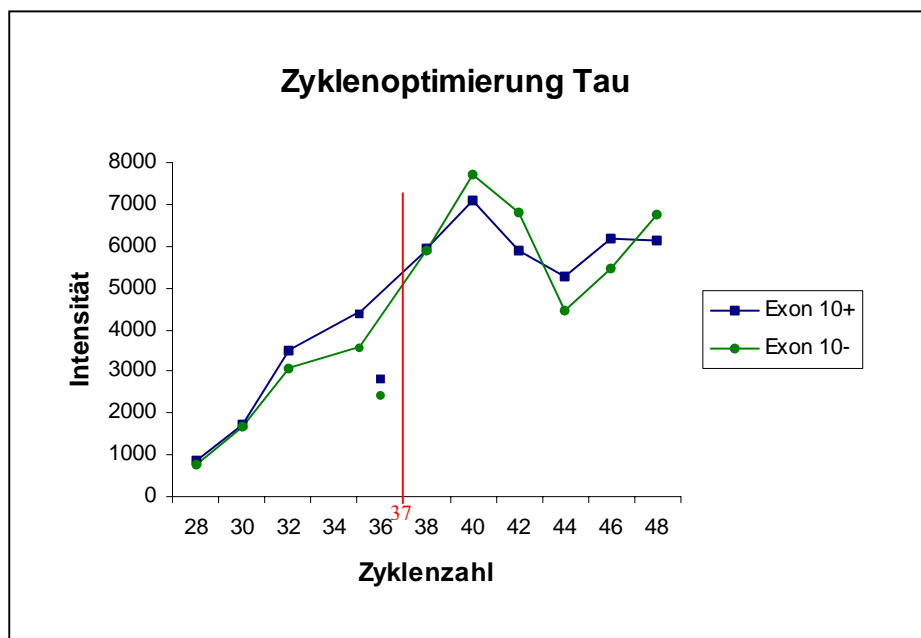


Abb. 19: Graphisch Darstellung der in Tabelle 11 angegebenen Werte

Die Zyklenzahl sollte im exponentiellen Bereich liegen, sodass für Tau 37 Zyklen als für diese Bedingungen optimal gewählt wurden.

3.2.6.5 Zyklen-Optimierung für Clk2 und Htra2- β

Für Clk2 und Htra2- β wurden 21 Zyklen sowohl im *Touch-down*-Modus als auch im normalen PCR-Modus mit entsprechenden Annealing-Temperaturen zugrunde gelegt, wodurch für beide Versuchsteile das gleiche Programm verwendet werden konnte [165].

3.2.6.6 Reaktionsansatz und Versuchsbedingungen für Tau

In Tabellen Tab. 16 und Tab. 17 sind die für die PCR eingesetzten Reagenzien und deren Volumina aufgeführt:

Tab. 16: PCR-Ansatz 1 Tau

Reagenzien	Volumen/Probe
vorgelegte cDNA	5 μ l
PCR-Wasser	23 μ l
Puffer G	10 μ l
dNTP	5 μ l
taun9f	3 μ l
taun13r	3 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	1 μ l
Volumen Reagenzien	45 μ l
Endvolumen	50 μ l

Tab. 17: PCR-Ansatz 2 Tau

Reagenzien	Volumen/Probe
vorgelegte cDNA	5 μ l
PCR-Wasser	27 μ l
Puffer G	10 μ l
dNTP	1 μ l
taun9f	3 μ l
taun13r	3 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	1 μ l
Volumen Reagenzien	45 μ l
Endvolumen	50 μ l

Die zwei Ansätze unterscheiden sich in der Menge der zugesetzten dNTP. Im Verlaufe der Arbeit nahm die Effizienz der Reaktion stark ab. Aufgrund verschiedener Versuche kann davon ausgegangen werden, dass sich die Konzentration der dNTP verändert haben muss. Aus diesem Grund wurde ein zweiter PCR-Ansatz gewählt, der eine geringere Konzentration an Nukleotiden aufweist (Tab. 16 und Tab. 17).

Abgesehen von der cDNA wurden die Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge in Form eines Mastermixes gemischt, von dem wiederum je 45 μ l auf die vorgelegte cDNA pipettiert wurde. Die Einhaltung der Reihenfolge ist deshalb wichtig, da z.B. eine zu frühe Zugabe von dNTP und *Taq*-Polymerase zu unspezifischen Amplifikationen führen kann. Die Reaktionen wurden in 0,2ml Gefäßen steril auf Eis angesetzt. Zusätzlich wurden Negativproben pipettiert, die anstelle der cDNA entweder Produkt aus der RT-Negativprobe oder PCR-Wasser

enthielten. Auf diese Weise wurde ausgeschlossen, dass eine Kontamination mit Fremd-DNA stattgefunden hat. Sofort nach Zugabe des Mastermixes wurden die Ansätze in den Thermocycler „Mastercycler“ gestellt, der zuvor bereits auf die Denaturierungstemperatur von 94°C vorgeheizt wurde (PCR-Programm siehe Tab. 18). Das „Vorheizen“ des Heizblocks diene der Vermeidung unspezifischer Produkte, deren Entstehung durch niedrige Temperaturen gefördert wird. Die so amplifizierten Fragmente umfassten eine Länge von 495bp bzw. 402bp (Tab. 19).

Tab. 18: PCR-Programm Tau

Schritt	Temperatur	Zeit [min]
initiale Denaturierung	94°C	5:00
<u>32 Zyklen:</u>		
Denaturierung	94°C	1:00
Annealing	56°C	1:00
Elongation	72°C	1:00
abschließende Elongation	72°C	7:00
Abkühlung	auf 4°C	

Tab. 19: PCR Produkte Tau

Sequenz	Länge
Tau Exon 10+	495bp
Tau Exon 10-	402bp

3.2.6.7 Reaktionsansatz und Versuchsbedingungen für Clk2 und Htra2-β

Alle Angaben entstammen der Diplomarbeit von Frank Berendt [165].

Die Reaktion wurde in 0,2ml Gefäßen steril auf Eis angesetzt. Im Mastercycler wurde ein *Touch-down*-Programm gewählt, d.h. die Annealing-Temperatur wird mit jedem Zyklus um einen festgelegten Wert reduziert [169]. Hohe Annealing-Temperaturen führen zu einer sehr spezifischen Amplifikation, während niedrigere Temperaturen die Ausbeute steigern. Die *Touch-down*-PCR vereinigt diese Eigenschaften in einem Programm. Die gewählten Bedingungen sind in den Tabellen 20–22 zusammengefasst.

Tab. 20: PCR-Ansatz Clk2

Reagenzien	Volumen/Probe
vorgelegte cDNA	5 µl
PCR-Wasser	30 µl
Puffer O	10 µl
dNTP	2 µl
fbclkf2	3 µl
fbclkr1	3 µl
Taq-Polymerase	1 µl
Volumen Reagenzien	49 µl
Endvolumen	54 µl

Tab. 21: PCR-Ansatz Htra2-β

Reagenzien	Volumen/Probe
vorgelegte cDNA	5 µl
PCR-Wasser	30 µl
Puffer K	10 µl
dNTP	2 µl
fbtrafl	3 µl
fbtrar1	3 µl
Taq-Polymerase	1 µl
Volumen Reagenzien	49 µl
Endvolumen	54 µl

Tab. 22: PCR-Programm Clk2 und Htra2-β

Schritt	Temperatur	Zeit [min]
initiale Denaturierung	94°C	5:00
<u>21 Zyklen:</u>		
Denaturierung	94°C	0:30
Annealing	60°C, Δ-0,2°C/Zyklus	0:30
Elongation	72°C	1:00
<u>21 Zyklen:</u>		
Denaturierung	94°C	0:30
Annealing	56°C	0:30
Elongation	72°C	1:00
abschließende Elongation	72°C	10:00
Abkühlung	auf 4°C	

3.2.7 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine einfache Methode, um die Länge und Reinheit von DNA-Molekülen zu bestimmen. Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Migration geladener Partikel in einem elektrischen Feld. Die Gelelektrophorese ist für DNA-Moleküle besonders einfach, da jedes Nukleotid in einem Nukleinsäuremolekül bereits eine negative Ladung trägt. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA-Moleküle durch die Agarose-Matrix wandern, ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe der DNA-Fragmente. Des Weiteren hängt die Migration von der Stromstärke, den Pufferbedingungen und der Agarosekonzentration ab. Mit Agarosegelen lassen sich DNA-Fragmente über einen Größenbereich von etwa 100bp bis zu 50kb auftrennen.

Agarose ist ein Polysaccharid, das aus roten Meeresalgen gewonnen wird. Das Pulver wird in Elektrophoresepuffer aufgenommen und durch Erhitzen in Lösung gebracht. Die Vielzahl an Hydroxylgruppen ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen, durch die bei Abkühlung die großporige Gelmatrix entsteht.

Für die Gelelektrophorese wurde eine 2%ige (Tau) bzw. 2,5%ige (Clk2 und Htra2- β) Agarose-Lösung mit 0,5x TBE-Puffer hergestellt und in der Mikrowelle auf Schmelztemperatur gebracht. Nach Zugabe von 2 μ l/100 ml Ethidiumbromid-Lösung wurde das Gel in der Gelkammer gegossen. Ethidiumbromid ist eine farbige Verbindung, die in die DNA-Helix interkaliert und bei Beleuchtung mit UV-Licht fluoresziert. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5x TBE-Puffer verwendet. Den einzelnen Proben wurde 5 μ l Loading Dye zugegeben. Loading Dye enthält Glycerin, das die Dichte der PCR-Probe erhöht und dadurch die DNA in die Geltaschen sinken lässt. 20 μ l bzw. 50 μ l des PCR-Produkts wurde in die Taschen geladen. Zur Identifizierung der Produktlängen wird auf das Gel zusätzlich ein DNA-Marker mit Fragmenten definierter Länge aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 90V Gleichspannung für eine Zeit von 45min (Tau) bzw. 40min (Clk2 und Htra2- β).

3.3 Western Blot

Die Bezeichnung Western Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik, Edwin Southern, zurück. Er entwickelte eine Technik für die Auftrennung und nachfolgende Hybridisierung von DNA-Fragmenten (Southern Blot). In Anlehnung daran wurde ein vergleichbares Verfahren zum Nachweis von RNA später als Northern Blot bezeichnet. Der Western Blot stellt einen nur annähernd ähnlichen spezifischen immunologischen Nachweis für Proteine dar.

Das Proteingemisch wird gelelektrophoretisch nach Molekulargewicht (z. B. SDS-PAGE), Ladung (isoelektrische Fokussierung) oder Molekulargewicht und Ladung (z.B. 2D-PAGE) aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine mit Hilfe eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes auf eine Trägermembran (z.B. Nylon, Nitrocellulose) transferiert, das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten. Die Membran wird nun mit einem mono- oder polyklonalen Antikörper (AK) (primärer AK) inkubiert, der gegen ein spezifisches Epitop des gesuchten Proteins gerichtet ist. Danach folgt eine zweite Inkubation mit einem Enzym-markierten sekundären Antikörper (z.B. alkalische Phosphatase, Peroxydase), der eine konservierte Domäne des primären AK erkennt. Visualisierung des fixierten Proteins erfolgt durch eine Enzym-katalysierte Farb- oder Lichtreaktion.

3.3.1 Gewinnung des Lysats und Probenbereitung

Zur Gewinnung des Protein-Lysats wurde das tiefgefrorene Gewebe mit *sample buffer* versetzt und durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen durch eine sterile Spritze und Kanüle homogenisiert, 5min auf 97°C erhitzt, danach zentrifugiert. Die eingesetzte Puffermenge richtete sich nach Menge des vorhandenen Gewebes (250mg Gewebe/1ml Puffer).

Zur Probengewinnung wurden 10µl des Überstandes mit 3x *SDS buffer* 5min bei 97°C gekocht, sofort auf Eis abgekühlt und zentrifugiert.

3.3.2 SDS-Page und Blot

Nach dem Auftrennen der präparierten Proben über ein 12%iges Polyacrylamidgel (RT, 100V/ca. 130min) wurden die Proteine mit Hilfe eines Tankblot-Systems auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (120V/45min, mittels Eis gekühlt). Im Laufe dieses Vorganges können Proteine teilweise renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, wodurch sie durch Antikörper erkennbar werden.

3.3.3 Blocking und Antikörper

Nach dem elektrophoretischen Transfer müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden, da sonst die Antikörper mit diesen ebenfalls interagieren würden und der spezifische Nachweis von Protein somit unmöglich wäre. In diesem Versuch wurden die Membranen auf einem Schüttler bei Raumtemperatur viermal 15min mit 1x NET Gelatine geblockt.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper (rabbit-anti-ps568/tra, Verdünnung 1:1000) erfolgte bei leichtem Schütteln bei Raumtemperatur über Nacht. Nach dem Entfernen der AK-Lösung wurde die Membran dreimal 20min mit 1x NET Gelatine gewaschen (Schüttler). Der anschließend zugegebene sekundäre Antikörper (HRP-konjugiert, Anti-rabbit Ig, Amersham, Verdünnung 1:2500) verblieb unter Bewegung bei Raumtemperatur für 2h auf der Membran. Im Anschluss danach erfolgte erneutes Waschen mit 1x NET Gelatine (dreimal 20min).

3.3.4 Detektion

Aufgrund des verwendeten sekundären Antikörpers (gekoppelt an eine Meerrettich-peroxidase) erfolgte die Detektion über eine Lichtreaktion. Eine 1:1 Mischung der Chemilumineszenz-Reagenzien *ECL1* und *ECL2* wurde auf die Membran gegeben und 30sec bis 1min unter Bewegung auf ihr belassen. Die leicht getrockneten Membranen wurden in Saran-Folie eingewickelt. Die Expositionszeit der Röntgenfilme betrug in Abhängigkeit zur Stärke des Signals 1sec bis 12h.

3.4 Auswertung

3.4.1 RT-PCR

Die Ablichtung der Gele wurde mit dem so genannten „Eagle Eye“ (Stratagene) durchgeführt. Mit diesem Gerät ist es möglich, das Gel mit UV-Licht zu bestrahlen und gleichzeitig zu fotografieren. Zusätzlich lassen sich die Bilder für die densitometrische Auswertung auf Datenträger speichern.

Die eigentliche Auswertung erfolgte mit dem Programm „TotalLab“ der Firma Phoretix (Tab. 23). Dieses Programm ermöglicht eine sehr präzise Messung der Intensitäten der einzelnen Banden. Dabei gilt die (integrierte) Dichte des jeweiligen DNA-Fragments als Dichtewert. Diese Dichtewerte wurden schließlich in das Statistikprogramm SPSS 11.0 eingegeben (Tab. 23) und je das relative Verhältnis der beiden Isoformen in den einzelnen Hirnregionen berechnet. Nach Ausschluss der Ausreißer mittels Boxplots, einer Methode der explorativen Datenanalyse, wurden die Daten aggregiert und anschließend statistisch mittels t-Test für unabhängige Stichproben ausgewertet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ akzeptiert.

3.4.2 Western Blots

Die Filme der Western Blots wurden eingescannt und ebenfalls mit dem Programm „TotalLab“ der Firma Phoretix ausgewertet. Anschließend wurden mögliche Signifikanzen mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests berechnet. Dieses Programm stand uns über das Statistikprogramm SPSS 11.0 zur Verfügung.

Tab. 23: Auswertungssoftware

Name	Firma
TotalLab	Phoretix, Newcastle UK (Demoversion)
SPSS 11.0	Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, 2001

1 Ergebnisse

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass ca. 45-60% aller menschlichen Gene alternativ gespleißt werden [101;102]. Diese Tatsache spielt eine nicht außer Acht zu lassende Rolle bei der Beurteilung von Krankheitsgenesen, da Fehlregulationen innerhalb alternativer Spleißvorgänge maßgeblich an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sein können. Vor allem im Bereich der Tauopathien sind veränderte Spleißmuster und daraus resultierende Verschiebungen der Isoformenverhältnisse ein sehr wichtiger Betrachtungspunkt. Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Fehlern im Spleißverhalten und der Entstehung einer Krankheit konnte bereits für die FTDP-17 gezeigt werden [170]. Diese Erkrankung zeichnet sich wie auch die Alzheimer-Erkrankung durch abnorm hyperphosphorylierte Tau-Aggregate aus. Das Tau-Gen unterliegt ebenso alternativen Spleißmechanismen wie der humane Transformer2-beta Htra2- β und die CDC-ähnliche Kinase Clk2. In Zellkulturexperimenten sind sowohl Htra2- β wie auch Clk2 nachweislich an der Regulation des alternativen Spleißprozesses von Tau Exon 10 beteiligt [158]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde deren Expression in humanem Hirngewebe (Präfrontal-, Temporal-, Okzipitalkortex und supplementärer Motokortex) von Alzheimer-Patienten untersucht.

1.1 RT-PCR Analyse

Für die Analyse der differentiellen RNA-Expression wurde aus jeweils fünf angrenzenden, tief gefrorenen Gewebestücken des präfrontalen Kortex, Temporal- und Okzipitalkortex sowie des supplementären Motokortex RNA extrahiert und mit den jeweils spezifischen Primerpaaren je zwei RT-PCRs durchgeführt.

Anschließend an die densitometrische Auswertung der Agarosegele wurden innerhalb der Versuchsreihen die Einzeldaten der Isoformen ins Verhältnis gesetzt, aggregiert und statistisch mittels t-Test für unabhängige Stichproben ausgewertet. Hierbei lag das akzeptierte Signifikanzniveau bei $p \leq 0,05$. Signifikante Ergebnisse wurden im Folgenden mit dem Symbol „*“, Tendenzen mit dem Symbol „◦“ gekennzeichnet.

Da eine wesentliche Voraussetzung des t-Tests die Normalverteilung darstellt, wurde vor der Datenaggregation auf mögliche Ausreißer getestet. Dies erfolgte mit Hilfe der explorativen Datenanalyse. Konventionsmethoden erlauben den Ausschluss von 5–10% der Werte.

1.1.1 Relative mRNA-Expression von tau +Exon 10/-Exon 10

Das humane Tau-Gen besteht aus 100kb und ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q21) lokalisiert. Es umfasst insgesamt 16 Exons und 15 Introns (Abb. 20). Im adulten Gehirn werden die Exons 2, 3 und 10 alternativ gespleißt, wobei Exon 10 für einen der vier MT-Bindungsrepeats kodiert.

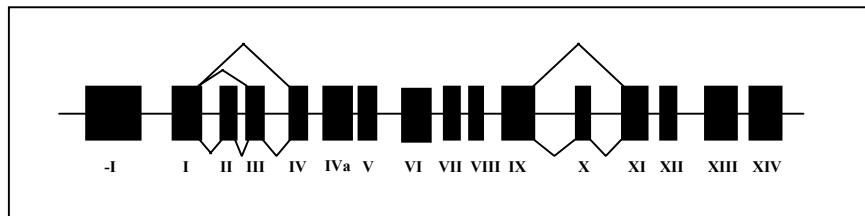


Abb. 20: Schematische Darstellung der Genstruktur des Tau-Gens

Die Exon-Intron Struktur ist wiedergegeben. Schwarze Rechtecke stellen Exons, die Verbindungslinien Introns dar. Alternative Spleißmuster sind angedeutet.

Durch die MT-Bindungsdomäne kann das Protein an die Mikrotubuli binden und hat somit Einfluss auf die MT-Stabilität wie auch auf längsaxonale Transporte. Störungen innerhalb dieses Systems können schwerwiegenden Einfluss auf den Zellstoffwechsel besitzen, was im Niedergang der Zelle resultieren kann. Starke Gewebedegenerationen im Gehirn gehen in der Alzheimer-Erkrankung mit den charakteristischen Ablagerungen hyperphosphorylierten Tau-Proteins einher. Ein Fehler beim Spleißen von Exon 10 könnte maßgeblich an diesen Prozessen beteiligt sein.

Bei dem untersuchten Gewebe handelt es sich um humanes *post mortem* Hirngewebe aus präfrontalem, temporalem, okzipitalem Kortex sowie aus dem supplementären Motokortex. Sowohl der präfrontale wie auch der temporale Kortex sind von der Alzheimer-Erkrankung sehr früh betroffene Regionen, d.h. Veränderungen müssten sich hier als erstes bemerkbar machen. Der okzipitale Kortex und supplementäre Motokortex dagegen dienen als Kontrollregionen. Verwendet wurden 39 Gehirne (17 Kontrollen, 22 Demenzgehirne), die *post mortem* nach anerkannten Kriterien neuropathologisch untersucht und eingestuft wurden. Das Alter der Patienten betrug zum Todeszeitpunkt in der Alzheimer-Gruppe im Mittel 81 Jahre, das der Kontrollen 77 Jahre (Tab.8-11, S. 40-42).

1.1.1.1 Das relative Verhältnis von tau +Exon 10/-Exon 10 ist im präfrontalen Kortex signifikant erhöht

Der präfrontale Kortex stellt eine in der Progression der Alzheimer-Erkrankung besonders früh betroffene Region dar. Kennzeichnend sind exzessive Ablagerungen, die mit starker Neurodegeneration einhergehen.

Nach reverser Transkription und PCR-Analyse (Abb. 21) aus Gewebeproben von 15 Alzheimer-Patienten und 9 Kontrollen erfolgt eine densitometrische Auswertung der mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegele (Total Lab).

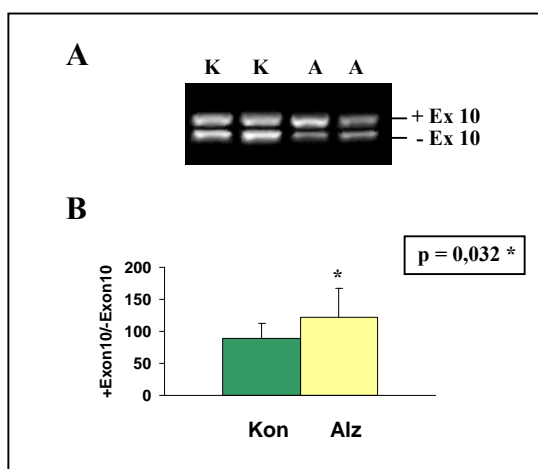


Abb. 21: Verändertes Expressionsmuster der tau-Isoformen +Exon 10 und -Exon 10 im Präfrontalkortex

- A. Repräsentatives Agarosegel der RT-PCR.
B. Graphische Darstellung der statistischen Auswertung

Kon/K Kontrollen, **Alz/A** Alzheimer

Hierbei zeigen die aggregierten Einzeldaten (optische Dichte der Gelbanden) des Verhältnisses tau +Exon 10/-Exon 10 (Tab. 24) nach statistischer Auswertung mittels t-Test einen signifikanten Unterschied. Die Isoform mit Exon 10 Einschluss ist in den Alzheimer-Gehirnen stärker exprimiert als in den Kontrollen ($T = -2,292$; $df = 22$; $p = 0,032^*$) (Abb. 21).

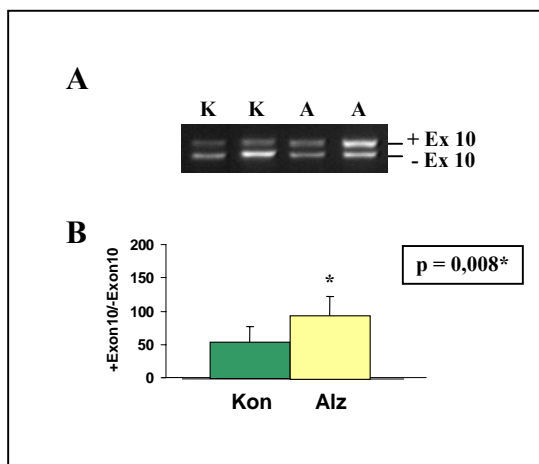
Tab. 24: Aggregierte Einzeldaten der tau Exon 10 mRNA-Expression im präfrontalen Kortex.

Die Werte stellen das Verhältnis der Dichtewerte der Banden +Exon10/-Exon10 dar.

Gruppe	Sek.-Nr	+Ex10/-Ex10	Gruppe	Sek.-Nr	+Ex10/-Ex10
Alzheimer	539 (1)	0,59	Kontrolle	99 (17)	0,80
	589 (2)	1,78		113 (18)	0,92
	611 (3)	1,42		518 (21)	1,02
	721 (4)	0,77		542 (22)	0,94
	759 (5)	1,60		543 (23)	1,16
	760 (6)	1,03		621 (24)	0,82
	764 (7)	0,97		673 (25)	0,38
	765 (8)	2,23		790 (27)	0,75
	766 (9)	0,60		838 (29)	0,86
	777 (10)	1,39			
	781 (11)	1,33			
	803 (12)	1,45			
	857 (13)	1,08			
	863 (14)	1,13			
	873 (15)	0,90			

1.1.1.2 Das relative Verhältnis von tau +Exon 10/-Exon 10 ist im Temporalkortex signifikant erhöht

Eine weitere Region, die bei der Alzheimer-Demenz relativ früh charakteristische Läsionen aufweist, ist der Temporalkortex. Auch hier zeigt sich ähnlich wie im Präfrontalkortex nach RT-PCR und Gelelektrophorese bei Gewebeproben von 14 Alzheimer-Patienten und 8 Kontrollen eine Veränderung im Verhältnis des mRNA-Expressionsniveaus der beiden Isoformen (Abb. 22).

**Abb. 22: Verändertes Expressionsmuster der tau-Isoformen +Exon 10 und -Exon 10 im Temporalkortex**

A. Repräsentatives Agarosegel der RT-PCR

B. Graphische Darstellung der statistischen Auswertung

Kon/K Kontrollen, **Alz/A** Alzheimer

Die statistische Auswertung der aggregierten Einzeldaten (Tab. 25) mittels t-Test bestätigte unsere Hypothese, dass auch im Temporalkortex die Isoform tau +Exon 10 in Alzheimer-Gehirnen stärker exprimiert ist ($T = -2,964$; $df = 20$; $p = 0,008^*$) (Abb. 22).

Tab. 25: Aggregierte Einzeldaten der tau Exon 10 mRNA-Expression im Temporalkortex

Die Werte stellen das Verhältnis der Dichtewerte der Banden +Exon10/-Exon10 dar.

Gruppe	Sek.-Nr	+Ex10/-Ex10	Gruppe	Sek.-Nr	+Ex10/-Ex10
Alzheimer	539 (1)	0,93	Kontrolle	99 (17)	0,89
	589 (2)	1,68		113 (18)	0,55
	721 (4)	1,02		518 (21)	0,75
	759 (5)	1,31		542 (22)	0,96
	760 (6)	0,67		621 (24)	0,35
	764 (7)	1,07		673 (25)	0,60
	765 (8)	1,57		790 (27)	0,77
	766 (9)	1,09		838 (29)	0,40
	777 (10)	1,11			
	781 (11)	1,13			
	803 (12)	0,84			
	857 (13)	0,86			
	863 (14)	0,68			
	873 (15)	0,59			

1.1.1.3 Das relative Verhältnis von tau +Exon 10/-Exon 10 zeigt im Okzipitalkortex keinen signifikanten Unterschied

Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Regionen präfrontaler und temporaler Kortex, ist der okzipitale Kortex bei der Alzheimer-Erkrankung in der Regel sehr spät bzw. gar nicht betroffen. Für Untersuchungen bezüglich des Ein- oder Ausschlusses von tau Exon 10 eignet er sich demnach als potentielle Kontrollregion.

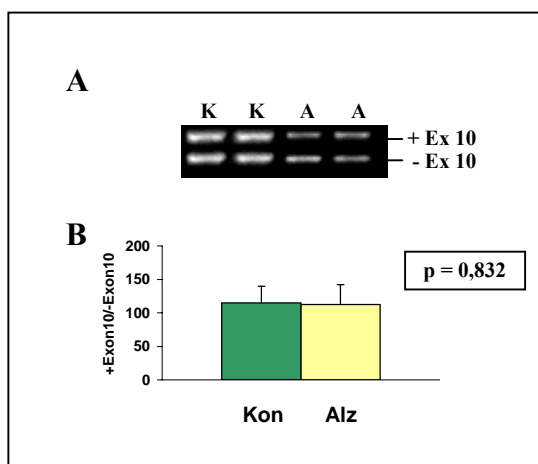


Abb. 23: Expressionsmuster der tau-Isoformen +Exon 10 und -Exon 10 im Okzipitalkortex

- A. Repräsentatives Agarosegel der RT-PCR
- B. Graphische Darstellung der statistischen Auswertung

Kon/K Kontrollen, Alz/A Alzheimer

RT-PCR Experimente (Abb. 23) konnten unsere Hypothese bestätigen, dass im Okzipital-kortex kein Unterschied zwischen Alzheimer-Patienten und Kontrollen besteht. Bei einem Vergleich der mRNA-Expression der unterschiedlichen tau-Isoformen konnte zwischen 15 Alzheimer-Gehirnen und 7 Kontrollen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die statistische Auswertung erfolgte nach Datenaggregation (Tab. 26) mittels t-Test ($T = 0,214$; $df = 20$; $p = 0,832$) (Abb. 23).

Tab. 26: Aggregierte Einzeldaten der tau Exon 10 mRNA-Expression im Okzipitalkortex

Die Werte stellen das Verhältnis der Dichtewerte der Banden +Exon10/-Exon10 dar.

Gruppe	Sek.-Nr	+Ex10/-Ex10	Gruppe	Sek.-Nr	+Ex10/-Ex10
Alzheimer	539 (1)	0,59	Kontrolle	113 (18)	1,09
	589 (2)	1,59		518 (21)	0,88
	611 (3)	1,26		542 (22)	0,93
	721 (4)	1,2		543 (23)	1,39
	759 (5)	1,23		621 (24)	1,14
	760 (6)	1,21		790 (27)	1,63
	764 (7)	1,16		838 (29)	1,02
	765 (8)	0,99			
	766 (9)	0,97			
	777 (10)	1,06			
	781 (11)	0,83			
	803 (12)	1,83			
	857 (13)	0,96			
	863 (14)	1,06			
	873 (15)	0,93			

1.1.1.4 Der supplementäre Motokortex zeigt keinen Unterschied im relativen Verhältnis von tau +Exon 10/-Exon 10

Ebenso wie im okzipitalen Kortex scheinen Veränderungen im supplementären Motokortex eine geringe Rolle für die Alzheimer-Erkrankung zu spielen, sodass auch diese Region als potentielle Negativkontrolle bezüglich veränderter Tau-mRNA Isoformexpression verwendet werden kann. Beim Vergleich des Verhältnisses tau +Exon 10/-Exon 10 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen je 5 Kontroll- und Alzheimer-Gehirnen festgestellt werden (Abb. 24).

Die statistische Auswertung der aggregierten Daten mittels t-Test ergab einen p-Wert von 0,339 ($T = -1,016$; $df = 8$) (Tab. 27, Abb. 24).

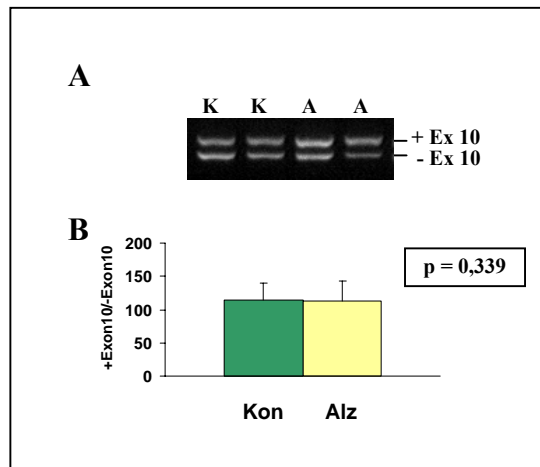


Abb. 24: Expressionsmuster der tau-Isoformen +Exon 10 und -Exon 10 im supplementären Motokortex

A. Repräsentatives Agarosegel der RT-PCR

B. Graphische Darstellung der statistischen Auswertung

Kon/K Kontrollen, **Alz/A** Alzheimer

Tab. 27: Aggregierte Einzeldaten des Verhältnisses tau +Exon10/-Exon10 im supplementären Motokortex

Die Werte stellen das Verhältnis der Dichtewerte der Banden +Exon10/ -Exon10 dar.

Gruppe	Sek.-Nr	+Ex10/-Ex10	Gruppe	Sek.-Nr	+Ex10/-Ex10
Alzheimer	30/688/94 (1)	1,61	Kontrolle	33/17/96 (9)	1,27
	30/222/95 (2)	1,04		09/264/97 (10)	1,67
	30/276/94 (5)	0,83		33/300/95 (11)	0,91
	09/29/97 (7)	0,86		13/009/94 (12)	1,40
	13/14/96 (8)	1,13		13/12/96 (13)	1,18

1.1.1.5 Zusammenfassende Gegenüberstellung der Tau Ergebnisse

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der einzelnen Hirnregionen verdeutlicht, dass Tau mit Einschluss von Exon 10 im präfrontalen Kortex und Temporalkortex in den Alzheimer-Gehirnen verstärkt exprimiert ist (Abb. 25). Beide Regionen sind bereits zu Beginn der Alzheimer-Erkrankung durch starke Veränderungen gekennzeichnet. Im Gegensatz zu diesen ist der Okzipitalkortex wie auch der supplementäre Motokortex nicht oder erst sehr spät betroffen. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider, es treten dort keine signifikanten Unterschiede zwischen Alzheimer- und Kontrollgruppe auf.

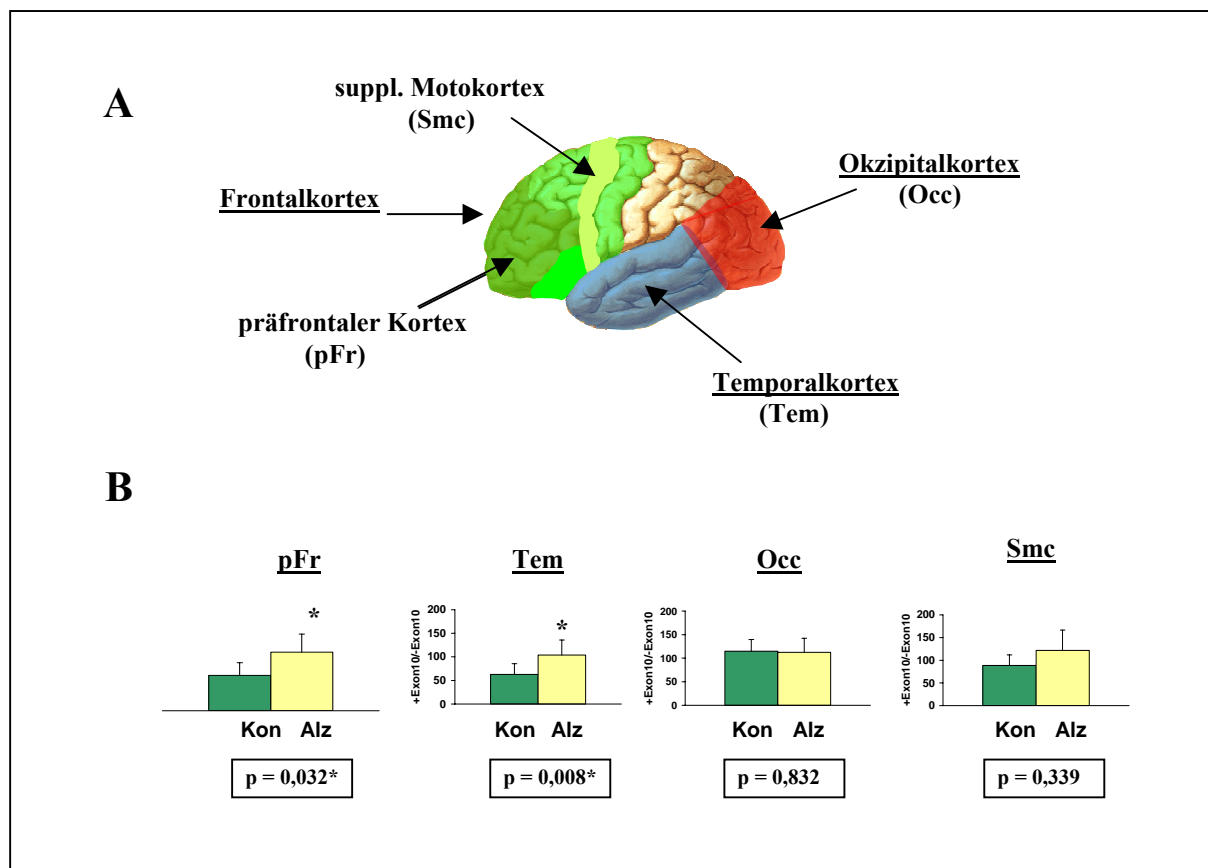


Abb. 25: Regionenvergleich der tau Auswertung

- A. Lateralansicht des humanen Gehirns. Frontal- (grün), Temporal- (blau) und Okzipitalkortex (rot) sind schematisch angedeutet. Der supplementäre Motokortex (hellgrün) und der präfrontale Kortex (olivgrün) sind Teile des Frontalkortex.
- B. Darstellung der statistischen Auswertung für tau Exon 10 mittels t-Test. Die Ergebnisse der einzelnen Hirnregionen sind nebeneinander aufgeführt.

1.1.2 Relative mRNA-Expression von htra2- β 1/ htra2- β 3

Als SR-ähnliches Protein ist Htra2- β , ähnlich wie SR-Proteine in der Lage, die Auswahl alternativer Spleißstellen in Abhängigkeit von seiner Konzentration direkt zu beeinflussen [140-142]. Für den *trans*-Faktor Htra2- β konnte in Zellkulturexperimenten bereits ein Einfluss

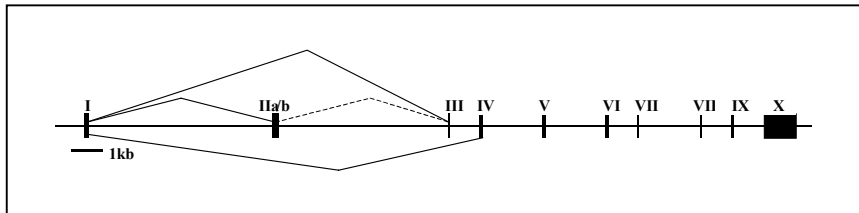


Abb. 26: Schematische Darstellung der Genstruktur des Htra2- β Gens

Die Exon-Intron Struktur ist maßstabgetreu wiedergegeben. Schwarze Rechtecke stellen Exons, die Verbindungslinien Introns dar. Alternative Spleißmuster sind angedeutet.

auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 nachgewiesen werden [158]. Das humane Htra2- β -Gen ist auf Chromosom 3q26.2-q27 lokalisiert. Es umfasst 9 Introns und 10 Exons, von denen zwei alternativ gespleißt werden (Abb. 26). Die erste SR-Domäne wird durch die Exons 3 und 4 kodiert, die zweite durch die Exons 7 und 9, sowie die RRM-Domäne durch Exon 5 und 6. Auch Htra2- β unterliegt alternativen Spleißvorgängen, wodurch sechs mRNA-Transkripte generiert werden können. Von diesen konnte allerdings nur für zwei - Htra2- β 1 und Htra2- β 3 - auch eine Translation ins Protein festgestellt werden [152]. Htra2- β 1 stellt die Volllängenform dar, die an exonische Enhancersequenzen in Tau Exon 10 binden kann, wodurch alternative Spleißstellen erkannt werden und das Exon eingeschlossen bleibt. Da die alternativen Isoformen Htra2- β 1 und β 3 in Zellkulturexperimenten unterschiedliche Auswirkungen auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 haben, ist es denkbar, dass sich ein durch Fehlspleißen des Htra2- β -Gens generiertes Missverhältnis dieser beiden alternativen Htra-Isoformen auch auf die Regulation des Spleißvorganges von Tau Exon 10 auswirkt.

1.1.2.1 Das relative Verhältnis von htra2-β1/htra2-β3 zeigt im Temporalkortex eine tendenzielle Veränderung

Da die mRNA-Expression des Tau-Gens bei einem Vergleich zwischen Alzheimer-Patienten und Kontrollen im Temporalkortex eine veränderte Isoformkomposition aufweist, wurde diese Region herangezogen, um mittels RT-PCR Experimenten die Darstellung des Isoformverhältnisses der htra2-β Isoformen zu versuchen. Hintergrund dieser Expressionsanalyse war die Überlegung, dass sich in Zellkulturexperimenten gewonnene Zusammenhänge zwischen Htra2-β und dem alternativen Spleißen von tau Exon10 auch in *in vivo* Veränderungen widerspiegeln lassen sollten.

Untersucht wurden Gewebeproben des Temporalkortex von 9 Alzheimer-Patienten und 8 Kontrollen. Der RT-PCR und densitometrischen Bestimmung der Bandenintensitäten von htra2-β1 und htra2-β3 schloss sich eine statistische Auswertung an (Abb. 27).

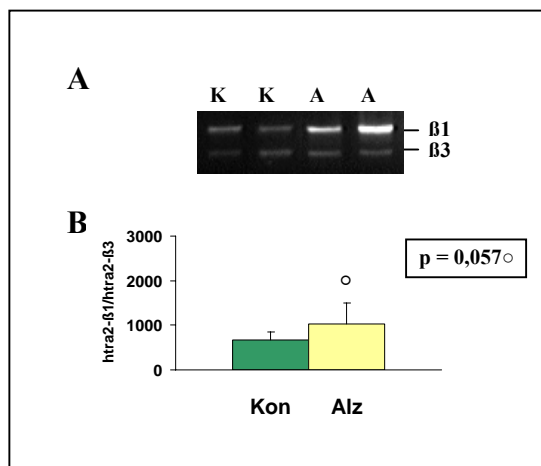


Abb. 27: Verändertes Expressionsmuster von htra2-β und htra2-β3 im Temporalkortex

A. Repräsentatives Agarosegel der RT-PCR
B. Graphische Darstellung der statistischen Auswertung

Kon/K Kontrollen, **Alz/A** Alzheimer

Hierbei zeigt sich, dass beim Vergleich der Isoformen htra2-β1 und htra2-β3 auf mRNA-Ebene ein signifikanter Unterschied zu detektieren ist. Die statistische Auswertung der aggregierten Einzeldaten mittels t-Test ergab, dass htra2-β1 in der Alzheimer-Gruppe verhältnismäßig stärker exprimiert ist als in der Kontrollgruppe ($T = -2,060$; $df = 15$; $p = 0,057$) (Tab. 28, Abb. 27).

Tab. 28: Aggregierte Einzeldaten des Verhältnisses htra2-β1/htra2-β3 im Temporalkortex

Die Werte stellen das Verhältnis der Dichtewerte der Banden htra2-β1/htra2-β3 dar.

Gruppe	Sek.-Nr	htra2-β1/β3	Gruppe	Sek.-Nr	htra2-β1/β3
Alzheimer	539 (1)	16,15	Kontrolle	99 (17)	5,20
	589 (2)	8,41		113 (18)	3,38
	759 (5)	14,02		518 (21)	8,81
	760 (6)	11,88		542 (22)	4,79
	764 (7)	13,60		621 (24)	7,22
	765 (8)	11,80		673 (25)	6,57
	777 (10)	2,33		790 (27)	9,68
	863 (14)	10,27		838 (29)	6,47
	873 (15)	3,58			

1.1.2.2 Das Verhältnis htra2-β1/htra2-β3 weist im Okzipitalkortex keinen signifikanten Unterschied auf

Ebenso wie bei den Experimenten zur differentiellen mRNA-Expression von tau Exon 10 wurde der Okzipitalkortex - als eine nicht oder erst sehr spät von den spezifischen hirn-morphologischen Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung betroffene Region - zur interregionalen Kontrolle herangezogen.

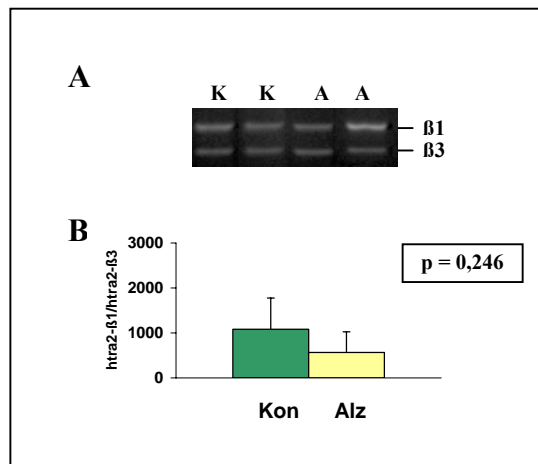


Abb. 28: Expressionsmuster der Isoformen htra2-β1 und htra2-β3 im Okzipitalkortex

A. Repräsentatives Agarosegel der RT-PCR
B. Graphische Darstellung der statistischen Auswertung

Kon/K Kontrollen, Alz/A Alzheimer

Die durchgeführten RT-PCR Versuche aus Gewebeproben von 6 Kontrollen bzw. 7 Alzheimer-Patienten weisen nach Auswertung im Okzipitalkortex hinsichtlich des relativen Verhältnisses von htra2-β1/htra2-β3 keinen signifikanten Unterschied auf. Die statistische Auswertung der aggregierten Daten mittels t-Test ergab einen p-Wert von $p = 0,246$ ($T = 1,226$; $df = 11$) (Tab. 29, Abb. 28).

Tab. 29: Aggregierte Einzeldaten des Verhältnisses htra2-β1/htra2-β3 im Okzipitalkortex

Die Werte stellen das Verhältnis der Dichtewerte der Banden htra2-β1/htra2-β3 dar.

Gruppe	Sek.-Nr	htra2-β1/β3	Gruppe	Sek.-Nr	htra2-β1/β3
Alzheimer	589 (2)	3,75	Kontrolle	113 (18)	0,79
	759 (5)	1,76		518 (21)	11,33
	764 (7)	14,29		542 (22)	15,41
	765 (8)	14,79		621 (24)	2,09
	781 (11)	11,66		790 (27)	11,58
	803 (12)	7,03		838 (29)	15,28
	857 (13)	1,24			

Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen von Frank Berendt komplettiert [165]. Er untersuchte im Rahmen seiner Diplomarbeit das Expressionsverhalten von htra2-β im präfrontalen Kortex wie auch im supplementären Motokortex. Er konnte zeigen, dass das Verhältnis von htra2-β1/htra2β3 bei Alzheimer-Patienten im präfrontalen Kortex - der bei Alzheimer-Erkrankung stark betroffenen Region - im Gegensatz zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ist, wohingegen im supplementären Motokortex (Kontrollregion) dieser Unterschied nicht festgestellt werden konnte.

1.1.2.3 Zusammenfassende Gegenüberstellung der htra2- β Ergebnisse

Beim Vergleich der Daten in den verschiedenen Hirnregionen konnte gezeigt werden, dass sich sowohl im präfrontalen Kortex wie auch im Temporalkortex die Expression der htra2- β Isoformen in den Alzheimer-Gehirnen von der in den Kontrollhirnen unterscheidet (Abb. 29). Der präfrontale Kortex zeigt eine signifikant verminderte Expression von htra2- β 1, wohingegen der Temporalkortex eine tendenziell verstärkte Expression dieser Isoform aufweist. Die von der Alzheimer-Erkrankung nicht oder erst sehr spät betroffenen Hirnregionen, Okzipitalkortex und supplementärer Motokortex, zeigen keine Unterschiede beim Vergleich der beiden Gruppen.

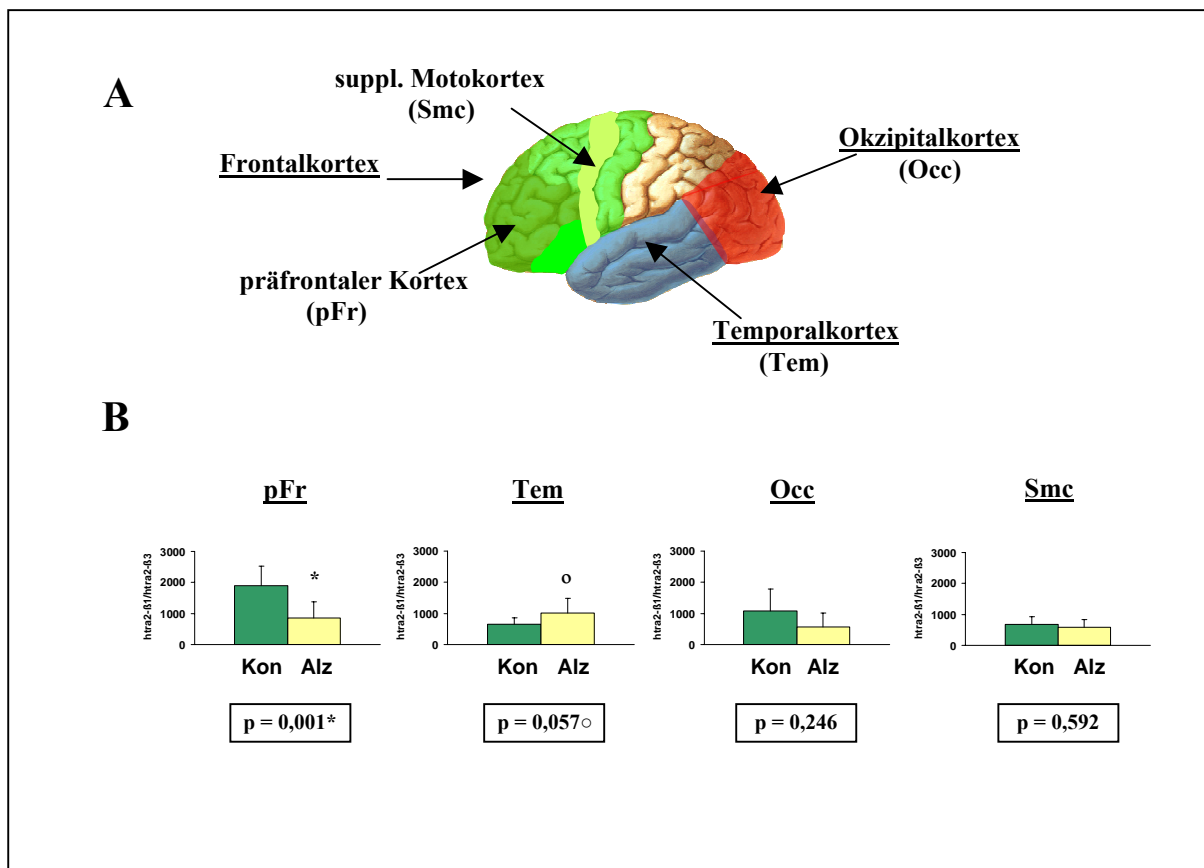


Abb. 29: Regionenvergleich der htra2- β Auswertung

- A. Lateralansicht des humanen Gehirns. Frontal- (grün), Temporal- (blau) und Okzipitalkortex (rot) sind schematisch angedeutet. Der supplementäre Motokortex (hellgrün) und der präfrontale Kortex (olivgrün) sind Teile des Frontalkortex.
- B. Darstellung der statistischen Auswertung für htra2- β mittels t-Test. Die Ergebnisse der einzelnen Hirnregionen sind nebeneinander aufgeführt.

1.1.3 Relative mRNA-Expression von clk2 +Exon4/+Exon4

Die Kinase Clk2 ist eine Proteinkinase, für die zusammen mit den anderen Mitgliedern ihrer Familie sowohl ein Einfluss auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 wie auch auf das des humanen Transformer2-beta auf Zellkulturebene nachgewiesen werden konnte. Bei einem Vergleich der Proteinkinasen Clk1-4 zeigte Clk2 die ausgeprägteste Wirkung [171]. Das

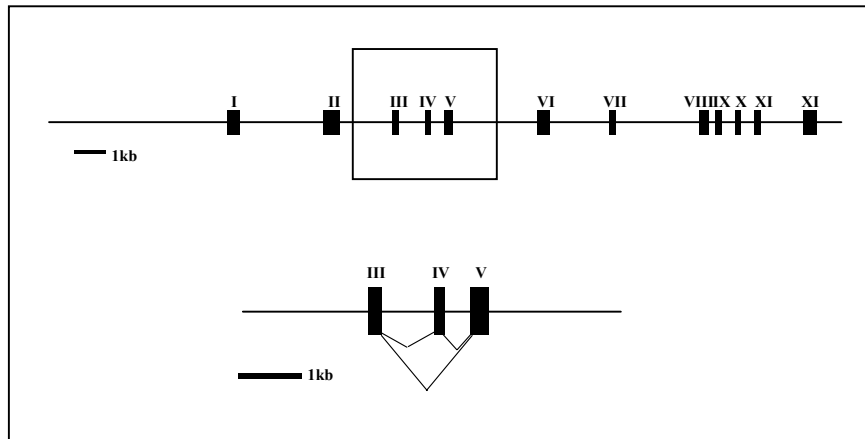


Abb. 30: Schematische Darstellung der Genstruktur des Clk2-Gens

Die Exon-Intron Struktur ist maßstabgetreu wiedergegeben. Schwarze Rechtecke stellen Exons, die Verbindungslinien Introns dar. Exon IV wird alternativ gespleißt.

humane Clk2-Gen ist auf Chromosom 1q21 lokalisiert, erstreckt sich über 10,5kb und ist aus 12 Exons und 11 Introns aufgebaut (Abb. 30). Durch alternatives Spleißen von Exon 4 werden zwei Isoformen generiert, die sich durch das Auftreten (Clk2 +Exon 4) bzw. Fehlen (Clk2 –Exon 4) einer Kinasedomäne unterscheiden. Das Fehlen der Kinasedomäne bewirkt den Verlust der Phosphorylierungsaktivität.

Da in Zellkulturexperimenten ein Einfluss von Clk2 auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 sowie auf Htra2- β Exon2/3 nachgewiesen werden konnte, diese SR-Proteinkinase demnach an der Regulation dieses potentiell für Alzheimer-Demenz wichtigen Spleißprozesses beteiligt zu sein scheint, lag es nahe die dadurch indizierten Veränderungen auf *post mortem* Ebene zu untersuchen. Insbesondere könnte eine Fehlregulation des alternativen Spleißens der Kinase Clk2 zu pathologischer Erniedrigung bzw. Erhöhung des entsprechenden Kinasespiegels führen und so die Regulation des alternativen Spleißens von Tau bzw. Htra2- β beeinflussen.

1.1.3.1 Das relative Verhältnis von clk2 +Exon4/-Exon4 ist im Temporalkortex signifikant erniedrigt

RT-PCR Experimente aus Gewebeproben des Temporalkortex von 14 Alzheimer-Patienten und 7 Kontrollen zeigen in der Agarosegelelektrophorese deutliche Expressionsunterschiede bezüglich des Clk2 +Exon4/-Exon4 Verhältnisses (Abb. 31).

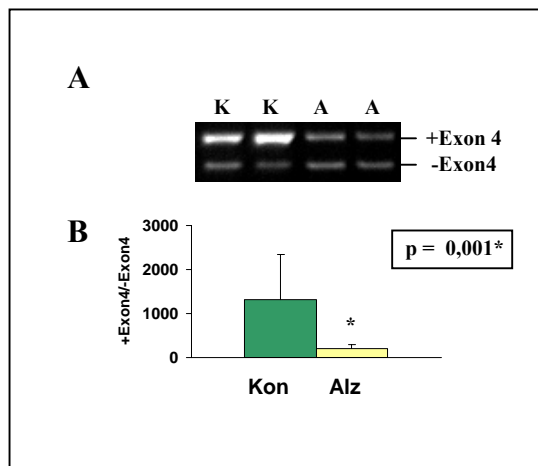


Abb. 31: Verändertes Expressionsmuster von clk2 -Exon 4 und clk2 +Exon 4 im Temporalkortex

A. Repräsentatives Agarosegel der RT-PCR
B. Graphische Darstellung der statistischen Auswertung

Kon/K Kontrollen, **Alz/A** Alzheimer

Die statistische Auswertung der aggregierten Daten des Temporalkortex mittels t-Test konnte zeigen, dass die Isoform clk2 +Exon 4 in den Alzheimer-Gehirnen signifikant weniger exprimiert wird ($T = 3,725$; $df = 19$; $p = 0,001^*$) (Tab. 30, Abb. 31).

Tab. 30: Aggregierte Einzeldaten des Verhältnisses clk2 +Exon4/-Exon4 im Temporalkortex

Die Werte stellen das Verhältnis der Dichtewerte der Banden +Exon4/-Exon4 dar.

Gruppe	Sek.-Nr	clk2 +Ex4/-Ex4	Gruppe	Sek.-Nr	clk2 +Ex4/-Ex4
Alzheimer	539 (1)	1,82	Kontrolle	99 (17)	2,36
	589 (2)	1,88		113 (18)	16,46
	611 (3)	1,17		518 (21)	4,16
	721 (4)	1,47		621 (24)	12,01
	759 (5)	4,07		673 (25)	30,77
	760 (6)	2,18		790 (27)	7,70
	765 (8)	2,60		838 (29)	7,28
	766 (9)	1,75			
	777 (10)	2,45			
	781 (11)	1,83			
	803 (12)	3,60			
	857 (13)	0,35			
	863 (14)	2,22			
	873 (15)	0,93			

1.1.3.2 Das relative Verhältnis von clk2 +Exon4/-Exon4 ist im Okzipitalkortex signifikant erniedrigt

Für Expressionsexperimente im Okzipitalkortex, einer Region, die wenig oder spät von den charakteristischen hirnmorphologischen Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung betroffen ist, wurde RT-PCR mit spezifischen Primern und anschließender densitometrischer Auswertung ethidiumbromidgefärbter Agarosegele für 13 Alzheimer-Patienten und 6 Kontrollen durchgeführt (Abb. 32).

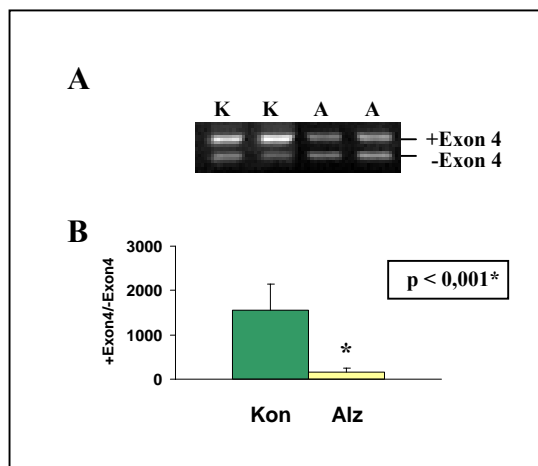


Abb. 32: Verändertes Expressionsmuster von clk2 -Exon 4 und clk2 +Exon 4 im Okzipitalkortex

A. Repräsentatives Agarosegel der RT-PCR

B. Graphische Darstellung der statistischen Auswertung

Kon/K Kontrollen, Alz/A Alzheimer

Auch hier konnte nach Aggregation der Einzeldaten und statistischer Berechnung mittels t-Test eine signifikant schwächere Expression von clk2 +Exon 4 in den Alzheimer-Gehirnen festgestellt werden ($T = 12,549$; $df = 17$; $p < 0,001^*$) (Tab. 31, Abb. 32).

Tab. 31: Aggregierte Einzeldaten des Verhältnisses clk2 +Exon4/-Exon4 im Okzipitalkortex

Die Werte stellen das Verhältnis der Dichtewerte der Banden +Exon4/-Exon4 dar.

Gruppe	Sek.-Nr	clk2 +Ex4/-Ex4	Gruppe	Sek.-Nr	clk2 +Ex4/-Ex4
Alzheimer	539 (1)	1,39	Kontrolle	113 (18)	18,47
	589 (2)	1,65		518 (21)	11,05
	611 (3)	1,10		543 (23)	14,71
	721 (4)	0,39		621 (24)	10,00
	759 (5)	3,75		790 (27)	15,67
	760 (6)	2,26		838 (29)	11,60
	765 (8)	0,65			
	766 (9)	1,39			
	777 (10)	1,25			
	781 (11)	2,29			
	803 (12)	2,41			
	857 (13)	0,34			
	863 (14)	2,05			

Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen von Frank Berendt komplettiert [165]. Er untersuchte im Rahmen seiner Diplomarbeit das Expressionsverhalten der CDC2-ähnlichen Kinase *clk2* im präfrontalen Kortex wie auch im supplementären Motokortex. Seine Ergebnisse konnten zeigen, dass im präfrontalen Kortex das Verhältnis *clk2* +Exon4/-Exon4 bei den Alzheimer-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt war. Ebenso weist der supplementäre Motokortex nach Reanalyse der Daten eine signifikante Erniedrigung in der Alzheimer-Gruppe auf.

1.1.3.3 Zusammenfassende Gegenüberstellung der clk2 Ergebnisse

Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse der einzelnen Hirnregionen wird deutlich (Abb. 33), dass die SR-Protein Kinase clk2 in allen vier untersuchten Hirnregionen bei den Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ein anderes Expressionsmuster zeigt. Die Isoform mit eingeschlossenem Exon 4, d.h. die Isoform mit Phosphorylierungsaktivität, ist sowohl im präfrontalen und temporalen Kortex wie auch im Okzipital- und supplementärmotorischen Kortex signifikant vermindert exprimiert.

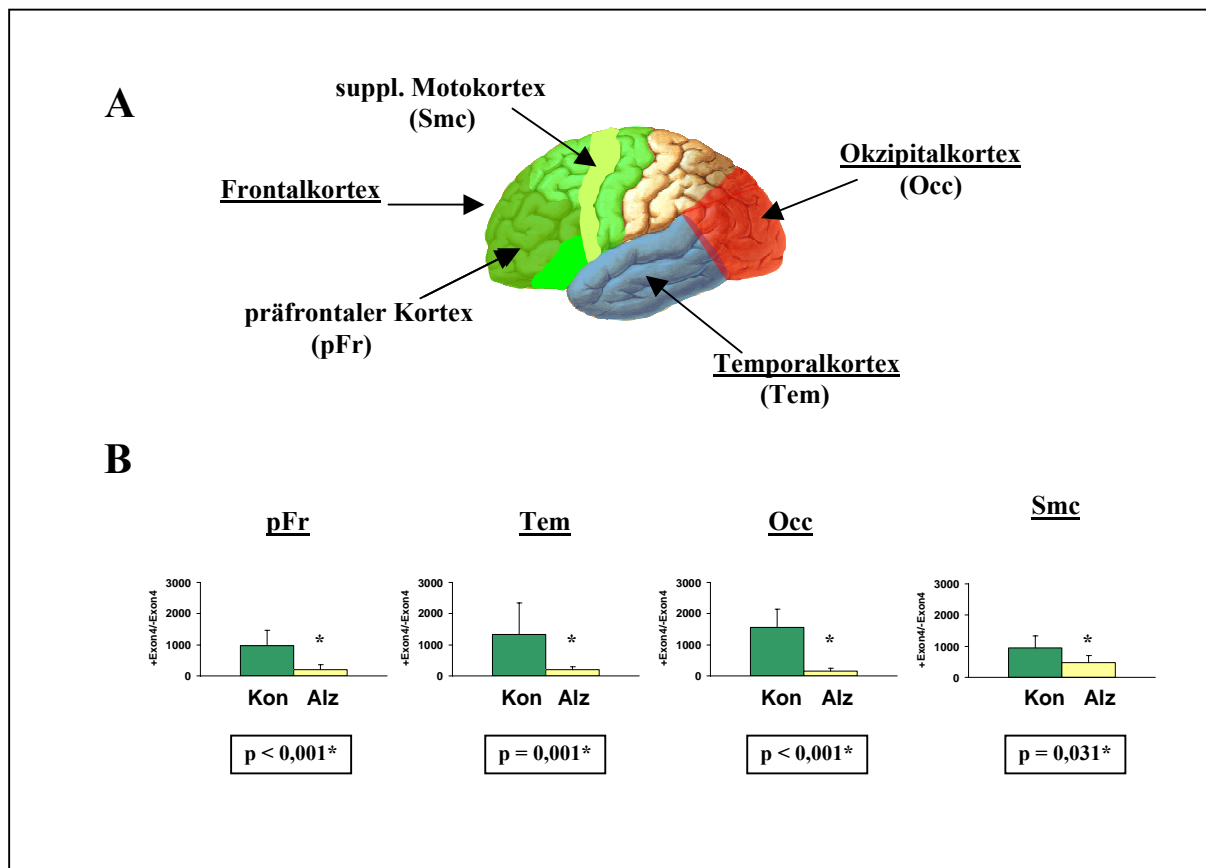


Abb. 33: Regionenvergleich der clk2 Auswertung

- Lateralansicht des humanen Gehirns. Frontal- (grün), Temporal- (blau) und Okzipitalkortex (rot) sind schematisch angedeutet. Der supplementäre Motokortex (schraffiert) und der präfrontale Kortex (gepunktet) sind Teile des Frontalkortex.
- Darstellung der statistischen Auswertung für clk2 Exon 4 mittels t-Test. Die Ergebnisse der einzelnen Hirnregionen sind nebeneinander aufgeführt.

1.2 Western Blots

Die Ergebnisse aus der mRNA-Analyse des humanen Transformer2-beta und bereits erfolgreich durchgeführte Zellkulturexperimente waren Grundlage für die im zweiten Teil der Arbeit etablierten Western Blots. Die Tatsache, dass auf mRNA-Ebene ein verändertes Expressionsmuster detektiert werden konnte, machte eine Untersuchung auf Proteinebene interessant. Die Frage war, ob sich die Veränderung auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene widerspiegeln würde. Zur Auswertung wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test herangezogen.

Aufbauend auf den Ergebnissen der mRNA-Analyse wurden folgende Hypothesen gewählt:

H₁ „Die Isoform hTRA2-β3 ist stärker exprimiert“

und

H₀ „Die Expression von hTRA2-β3 ist gleich oder geringer ausgeprägt“.

Letztere gilt es zu widerlegen. Tritt ein signifikanter Unterschied auf, kann die Aussage getroffen werden, dass die Expression von hTRA2-β3 nicht kleiner oder gleich der Konzentration in der anderen Gruppe ist bzw. dass hTRA2-β3 stärker exprimiert wird. Die Gruppe, in der hTRA2-β3 stärker exprimiert ist, ergibt sich aus dem Vergleich des mittleren Ranges der beiden Gruppen. Die Isoform hTRA2-β3 ist in derjenigen Gruppe verhältnismäßig stärker exprimiert, die den höheren mittleren Rang aufweist.

1.2.1 Expression der hTRA2-beta Isoformen auf Proteinebene

Durch alternative Spleißprozesse des Htra2-β-Gens können auf mRNA-Ebene insgesamt fünf Isoformen gebildet werden (htra2-β1 bis htra2-β5). Eine Translation ins Protein erfolgt allerdings nur für hTRA2-β1 und hTRA2-β3. Diese Isoformen unterscheiden sich durch den Ein- (hTRA2-β1) oder Ausschluss (hTRA2-β3) der Exons 2 und 3, die für eine der RS-Domänen kodieren (Abb. 34). Basierend darauf ergeben sich unterschiedliche Eigenschaften der Proteine. So konnte mittels *in vitro* Experimenten [158] gezeigt werden, dass die Volllängenform hTRA2-β1 an Enhancersequenzen in tau Exon 10 binden und *in vitro* wie auch in Zellkulturexperimenten den Einschluss dieses alternativ gespleißten Exon verstärkt. Die Isoform hTRA2-β3 führt in Zellkulturspleißassays zu einem verstärkten Ausschluss von tau Exon 10.

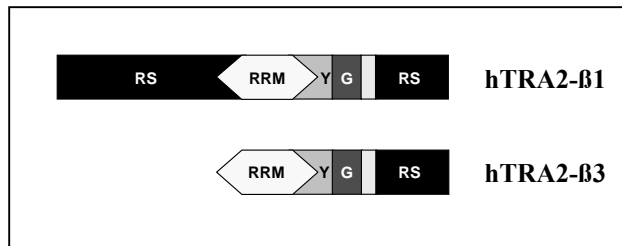


Abb. 34: Proteinstruktur der hTRA2-β Isoformen (nach [1])

RS SR-Domäne, **RRM** RNA-Erkennungsmotiv, **Y** tyrosinreiche Region, **G** glycinreiche Region.

1.2.1.1 hTRA2-β3 ist im präfrontalen Kortex von AD-Hirnen tendenziell stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe

Für den Nachweis des Proteinlevels der unterschiedlichen hTRA2-β Isoformen im präfrontalen Kortex wurde *post mortem* Gewebe von 9 Kontrollen und 14 Alzheimer-Patienten nach SDS-PAGE mittels Western Blot analysiert. Die densitometrische Auswertung der isoformspezifischen Banden des Western Blots zeigte bei einem Vergleich der Kontrollhirne mit den AD-Hirnen im präfrontalen Kortex bezüglich der hTRA2-β3 Expression einen tendenziellen Unterschied ($p=0,062$; $Z=-1,560$). Bei einem Vergleich des mittleren Ranges ist zu erkennen, dass die Isoform hTRA2-β3 in der Alzheimer-Gruppe in der Relation stärker exprimiert ist (Abb. 35).



Abb. 35: Western Blot des Präfrontalkortex

Es ist zu erkennen, dass die Isoform hTRA2-β3 in den Alzheimer-Gehirnen tendenziell stärker exprimiert ist als in den Kontrollen (anti-ps568/tra).

Kon Kontrollen, **Alz** Alzheimer

1.2.1.2 Der Temporalkortex zeigt keine signifikanten Unterschiede

Western Blot Analysen zur Expression der htra2-β Isoformen 1 und 3 aus Gewebeproben des Temporalkortex von 15 Alzheimer-Patienten versus 7 Kontrollen lieferten nach der statistischen Auswertung mittels Wilcoxon-Test keinen signifikanten Unterschied ($p=0,400$; $Z=-0,346$) (Abb. 36).

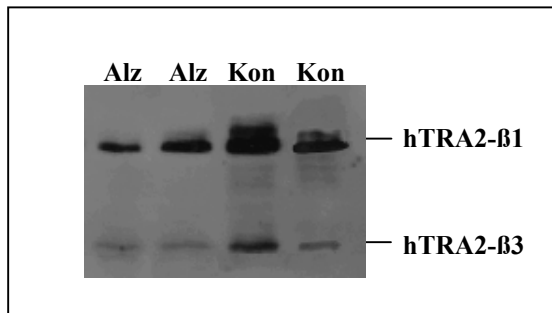


Abb. 36: Western Blot des Temporal-kortex

Der Vergleich der Isoformen zeigt im Western Blot keine Unterschiede zwischen AD- und Kontrollgruppe. (anti-ps568/tra).

Kon Kontrollen, **Alz** Alzheimer

1.2.1.3 Der Okzipitalkortex zeigt keine signifikanten Unterschiede

Im Okzipitalkortex, der als eine nicht oder kaum betroffene Kontrollregion verwendet wurde, konnte beim Vergleich des mittleren Ranges gezeigt werden, dass die relative Expression der hTRA2-β3 Isoform in der Kontrollgruppe (4 Proben) im Vergleich zur Alzheimer-Gruppe (11 Proben) keinen signifikanten Unterschied aufwies ($p=0,089$; $Z=-1,397$) (Abb. 37).

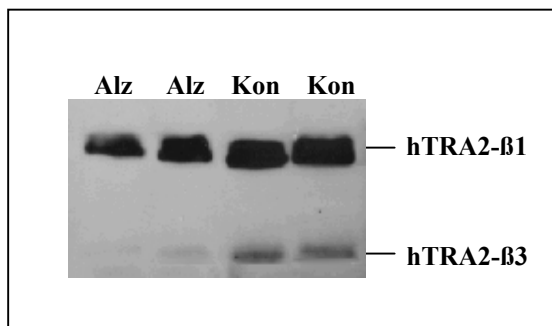


Abb. 37: Western Blot des Okzipital-kortex

Die relative Expression von hTRA-β3 zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Alzheimer-Gruppe. (anti-ps568/tra).

Kon Kontrollen, **Alz** Alzheimer

1.2.1.4 Gegenüberstellung der hTRA2-β Ergebnisse aus Western Blot und RT-PCR

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse von mRNA- bzw. Proteinexpression konnte gezeigt werden (Abb. 38), dass sich im präfrontalen Kortex die veränderte mRNA-Expression auf Proteinebene tendenziell widerspiegelte. Der Okzipitalkortex zeigt sowohl bei der RT-PCR-Auswertung wie auch beim Western Blot keine signifikanten Unterschiede zwischen Alzheimer- und Kontrollgruppe.

Der Temporalkortex dagegen weist auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Proteindarstellung ein abweichendes Expressionsmuster auf. Für die mRNA-Expression war ein signifikanter Unterschied zwischen Alzheimer- und Kontrollgruppe nachweisbar, der auf Proteinebene nicht dargestellt werden konnte.

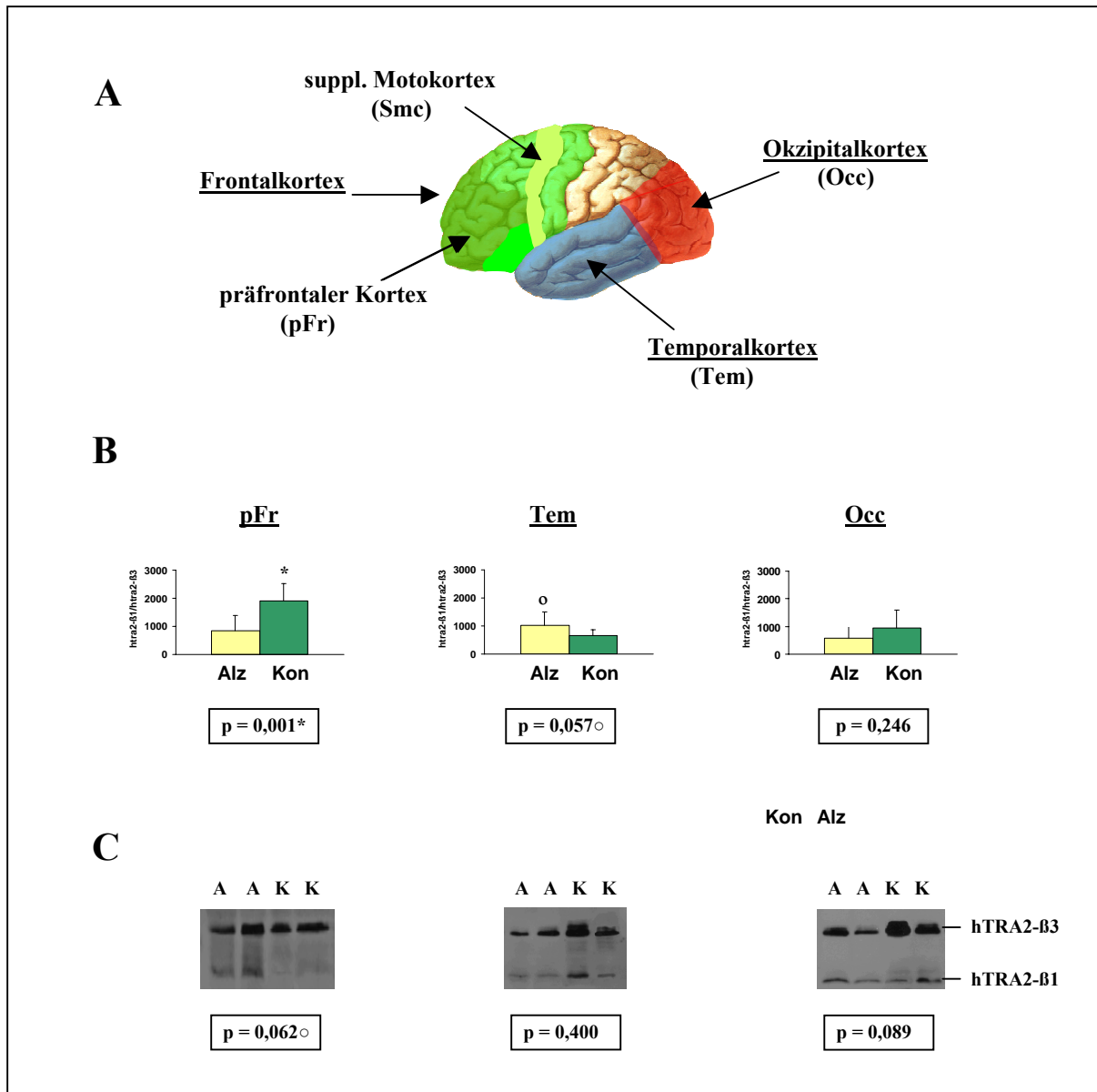


Abb. 38: Gegenüberstellung der Htra2-β Auswertungen

- A. Lateralansicht des humanen Gehirns.
Frontal- (grün), Temporal- (blau) und Okzipitalkortex (rot) sind schematisch angedeutet. Der supplementäre Motokortex (hellgrün) und der präfrontale Kortex (olivgrün) sind Teile des Frontalkortex.
- B. Darstellung der statistischen Auswertung für htra2-β mittels t-Test. Die Ergebnisse der einzelnen Hirnregionen sind nebeneinander aufgeführt.
- C. Western Blot

2 Diskussion

Es ist anzunehmen, dass komplexe neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Erkrankung kausal nicht nur auf einen Mechanismus zurückzuführen sind, sondern dass es zu einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren kommt. Dabei ist noch nicht geklärt, in wieweit die im Weiteren ausgeführten Hypothesen tatsächlich Kausalketten darstellen oder lediglich überlagernde Epiphänomene bedeuten.

In der Amyloid-Hypothese werden die Amyloid-Ablagerungen als Auslöser der Alzheimer-Pathogenese betrachtet. *Missense*-Mutationen in APP-, PS1- oder PS2-Genen bewirken die verstärkte Produktion von A β 42, das wiederum in erhöhtem Maße in den Amyloid-Plaques akkumulieren kann. Durch progressive synaptische und neuritische Schädigungen wird nicht nur die neuronale Ionen-Homöostase beeinträchtigt, sondern werden auch Kinase- und Phosphataseaktivitäten gestört. Letzteres fördert die Aggregation von Tau in neurofibrilläre Ablagerungen. Die beschriebenen Veränderungen führen zu weitreichenden neuronalen und synaptischen Dysfunktionen sowie selektiver Neurodegeneration [172-174].

Als ein weiterer pathologisch wichtiger Faktor wird oxidativer Stress für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung diskutiert. Sowohl freie Radikale, die während oxidativer Stresssituationen gebildet werden [175], wie auch Oxidation innerhalb fast aller Biomakromolekül-Klassen [176;177] konnten in direkten Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung gebracht werden. Bereits in sehr frühen Stadien zeigen Neuronen von Alzheimer-Patienten Zeichen oxidativer Schädigung [178;179].

Das Tau-Protein nimmt in der Alzheimer-Erkrankung zusammen mit dem β -Amyloid Protein eine Schlüsselrolle ein. Die Tau-Hypothese geht davon aus, dass neurofibrilläre Ablagerungen bestehend aus abnorm hyperphosphoryliertem Tau-Protein für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung verantwortlich sind [30]. Diese Annahme wird von Braak et al. unterstützt, die zeigen konnten, dass das typische zeitliche und räumliche Ausbreitungsmuster der Tau-Ablagerungen und die damit verbundene Neurodegeneration mit der progressiven Symptomatik der Alzheimer-Erkrankung korreliert [30;34].

Die im Endstadium extensiven Ablagerungen hyperphosphorylierten Tau-Proteins im Gehirn eines Alzheimer-Patienten scheinen für neurodegenerative Prozesse mitverantwortlich zu sein, auch wenn der tatsächliche kausale Zusammenhang noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Hyperphosphoryliertes Tau löst sich von den Tubulin-Dimeren und kann sich in Filamenten zusammenlagern. Die dieser Veränderung zugrunde liegenden Pathomechanismen sind Gegenstand intensiver Forschung.

Neuere Studien konnten zeigen, dass Spleißfehler im Regulationsmechanismus des alternativ gespleißten Tau Exons 10 eine kritische Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen spielen. Untersuchungen auf dem Gebiet der zu den Tauopathien zählenden neurodegenerativen Erkrankung FDTP-17 konnten bereits zeigen, dass sich bestimmte Mutationen im Tau-Gen durch einen erhöhten Einschluss des alternativ gespleißten Exon 10 auszeichnen [78]. Unterstützt wird diese Vermutung von der Tatsache, dass das alternativ gespleißte Exon 10 für eines der vier Mikrotubuli-Bindungsmotive kodiert [78] und dass das somit gestörte Verhältnis der mRNA-Isoformen bereits ausreichend zu sein scheint, um die Tau-Pathologie auslösen zu können. Dies impliziert, dass ein fein reguliertes Verhältnis der Isoformen 4R/3R von elementarer Bedeutung ist. Da ein Isoformenverhältnis 4R/3R von ungefähr 1:1 für den neuronalen Mikrotubuli-Aufbau wie auch für dessen Funktionsfähigkeit scheinbar unerlässlich ist, können Verschiebungen zu schwerwiegenden Störungen führen [39]. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Isoformen an den Mikrotubuli-Apparat, kann ein verändertes Verhältnis und der dadurch bedingte Überschuss einer Isoform zur Erhöhung des Pools an löslichem Tau-Protein führen. Dies wiederum kann ausschlaggebend für die Aggregation in Filamente sein, umso mehr, da die Isoformen 4R und 3R auch bei der Aggregation in PHF voneinander abweichende Strukturen mit unterschiedlichen Eigenschaften bilden [180]. Möglich erscheint, dass durch die veränderte Bindungsfähigkeit der Tau-Isoformen an den Mikrotubuli-Apparat Zellabläufe gestört werden, die im Untergang der Zelle resultieren.

Für diese Arbeit stand die Tau-Pathologie im Vordergrund. Grundlage waren Veröffentlichungen, die auf Zellkulturebene die Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 in kausalen Zusammenhang mit dem SR-ähnlichen Protein Htra2- β und der CDC-ähnlichen Kinase Clk2 bringen konnten [1;158;171]. In diesem Zusammenhang wurden die relativen Expressionslevel der Tau-mRNA Isoformen mit Exon 10 Einschluss bzw. Ausschluss in verschiedenen Regionen von Alzheimer- und Kontrollgehirnen untersucht. Da für die Alzheimer-Demenz keine Veränderungen im Tau-Gen bekannt sind, die einen Einfluss auf das alternative Spleißen von Exon 10 besitzen, ist es naheliegend, nach Spleißregulatoren bzw. Modulatoren wie SR-Proteinen und SR-Proteinkinasen zu suchen, die die beobachteten Verschiebungen im Expressionsmuster der Tau-mRNA Isoformen verursachen könnten. Dies wurde in Form von mRNA-Expressionsuntersuchungen für das SR-ähnlich Protein humaner Transformer2-beta und die SR-Protein Kinase Clk2 durchgeführt. Für diese in den Spleißprozess regulierend bzw. modulierend eingreifenden Proteine konnte bereits durch

Spleißassays in Zellkulturexperimenten ein Effekt auf das alternative Spleißen von Tau Exon 10 nachgewiesen werden [158].

2.1 Regionenspezifische Expression der tau-Isoformen in Alzheimer-Gehirnen

Neurofibrilläre Ablagerungen bestehend aus abnorm hyperphosphoryliertem Tau-Protein entwickeln sich zuerst in den Pyramidenzellen des transentorhinalen Kortex. Danach verbreiten sie sich über den entorhinalen Kortex, den Hippokampus und andere limbische Regionen, um schließlich auch in Assoziationskortex und dem zerebralen Kortex aufzutreten. Nicht-Assoziationsgebiete wie okzipitaler Kortex und supplementärer Motokortex, ebenso wie Basalganglien und Cerebellum bleiben weitgehend ausgespart.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob es zu einer unterschiedlichen Expression der Tau-Isoformen in den betroffenen Hirnregionen kommt, und zwar in einer zur NFT-Bildung analogen Regionenspezifität.

2.1.1 Der präfrontale und temporale Kortex ergaben auf mRNA-Ebene ein verändertes Verhältnis der Tau-Isoformen in Alzheimer-Gehirnen

Unsere Ergebnisse zeigten, dass sich das mRNA-Spleißmuster in den Alzheimer-Patienten von dem der Kontrollgruppe sowohl im präfrontalen wie auch im temporalen Kortex unterscheidet. Das relative Verhältnis +Exon 10/-Exon 10 war in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, was sowohl durch einen vermehrten Einbau dieses Exons wie auch durch einen verminderten Ausschluss hervorgerufen werden könnte. Beides würde in einem verhältnismäßig stärkerem Auftreten von tau +Exon 10 mRNA resultieren.

Auf Proteinebene könnte dies in einem gestörten Verhältnis der TAU 3R/4R Isoformen resultieren und so auf ein verändertes Bindungsverhalten an Mikrotubuli hinweisen. Die 4R-Isoform zeigt aufgrund ihrer zusätzlichen MT-Bindungsdomäne nicht nur eine ungefähr dreimal höhere Affinität zu Mikrotubulis als die 3R-Isoform, sondern kann den Zellapparat auch wesentlich stärker stabilisieren [69;70]. Bei einer erhöhten Konzentration an 4R-Isoformen wäre es denkbar, dass in Konkurrenz um Bindungsstellen diese Isoform in verstärktem Maße an die Mikrotubuli binden kann. Durch ihre wesentlich höher ausgeprägte Bindungsaffinität könnte der Prozess des stetigen Bindens und Dissoziierens von Tubulin-

Dimeren gestört werden. Die dynamische Stabilität des MT-Systems wäre nicht mehr gegeben, längsaxonale Transportvorgänge brechen zusammen und die Zelle geht zugrunde. Ein Missverhältnis der TAU-Isoformen ist ebenfalls charakteristisches Merkmal der FTDP-17. Sie umfasst eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die an autosomal-dominant vererbte Mutationen im Tau-Gen gekoppelt sind [170]. Von den bis heute 29 bekannten distinkten pathogenen Mutationen im Tau-Gen treten die meisten in Familien der FTDP-17 auf. Mehr als 90% dieser Mutationen sind in Exon 10 und den umgebenden Introns lokalisiert. Das hieraus resultierende veränderte alternative Spleißmuster von tau Exon 10 ist wahrscheinlich durch Beeinflussung regulatorischer Elemente auf der prä-mRNA bedingt. Die N279K-Mutation beispielsweise bewirkt eine Verstärkung eines purinreichen Enhancers in Exon 10, der den Einschluss von Exon 10 fördert [181]. Den gegenteiligen Effekt bewirkt die Mutation Δ K280, die dieses regulatorische Element zerstört [182]. Die Verschiebung des Isomerenverhältnisses scheint in der FTDP-17 bereits auszureichen, um eine Tau-Pathologie auslösen zu können.

In der Alzheimer-Erkrankung konnten bis heute noch keine Mutationen im Tau-Gen festgestellt werden. Dennoch ist diese Krankheit durch zerebrale Tau-Ablagerungen gekennzeichnet. Es ist denkbar, dass auch hier ein Fehler innerhalb des sehr komplexen Spleißprozesses von tau Exon 10 zur Entstehung der Erkrankung beitragen könnte.

In verschiedenen Tauopathien (FTDP-17, PSP, CBD) konnte auf Proteinebene eine Verschiebung der Isoformen 4R/3R nachgewiesen werden (zusammengefasst in [39]). In der AD war dies bis heute noch nicht möglich. Die Erklärung hierfür könnte u.U. bei postrationalen Mechanismen zu suchen sein [183;184], die starken Einfluss auf Protein-Konzentrationen besitzen. Eine entscheidende Rolle der postrationalen Protein-Kontrolle eukaryontischer Zellen spielt die Proteolyse über das Ubiquitin-System. Mittels Ubiquitinierung von Schlüsselproteinen kann Einfluss auf elementare Regulationsmechanismen wie Signalweiterleitung, Transkription und Zellzyklusregulation genommen werden. Durch Kennzeichnung der Proteine durch Ubiquitinmoleküle werden sie für proteasomale oder lysosomale Degradation erkennbar [185]. Eine besonders wichtige Rolle nimmt dieses System in der Entfernung defekter Proteine ein. Diese Eigenschaft verdeutlicht, dass ubiquitinierte Proteine sehr oft neben zerebralen Ablagerungen neurodegenerativer Erkrankungen auftreten. Auch für die Alzheimer-Erkrankung konnte bereits eine Ubiquitin-positive Immunreaktivität nachgewiesen werden [186]. Desweiteren ist bekannt, dass die Ubiquitin-Ligase CHIP (*carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein*) phosphoryliertes TAU selektiv ubiquitinieren kann [187;188]. Die Interaktion des

CHIP-Hsc70-Komplexes findet über eine Sequenz statt, die die Mikrotubuli-Bindungsdomäne mit einschließt. Es wäre somit denkbar, dass das Fehlen oder Auftreten eines zusätzlichen Bindungsmotivs auch hier Auswirkung auf die Bindungsaffinität des Komplexes haben könnte. Eine schwächere Bindung der 3R-Isoform würde somit in einer verminderten Ubiquitinierung resultieren, wodurch diese Isoform in verstärktem Maße in *tangles* aggregieren kann. Die ubiquitinierte 4R-Isoform dagegen wird anderen Prozessen zugeführt und kann dadurch nicht im vollen Ausmaß in den Tau-Ablagerungen wiedergefunden werden. Ein weiterer Betrachtungspunkt ist der Phosphorylierungsstatus des TAU-Proteins. Transfektionsexperimente konnten zeigen, dass CHIP ganz spezifisch phosphoryliertes TAU

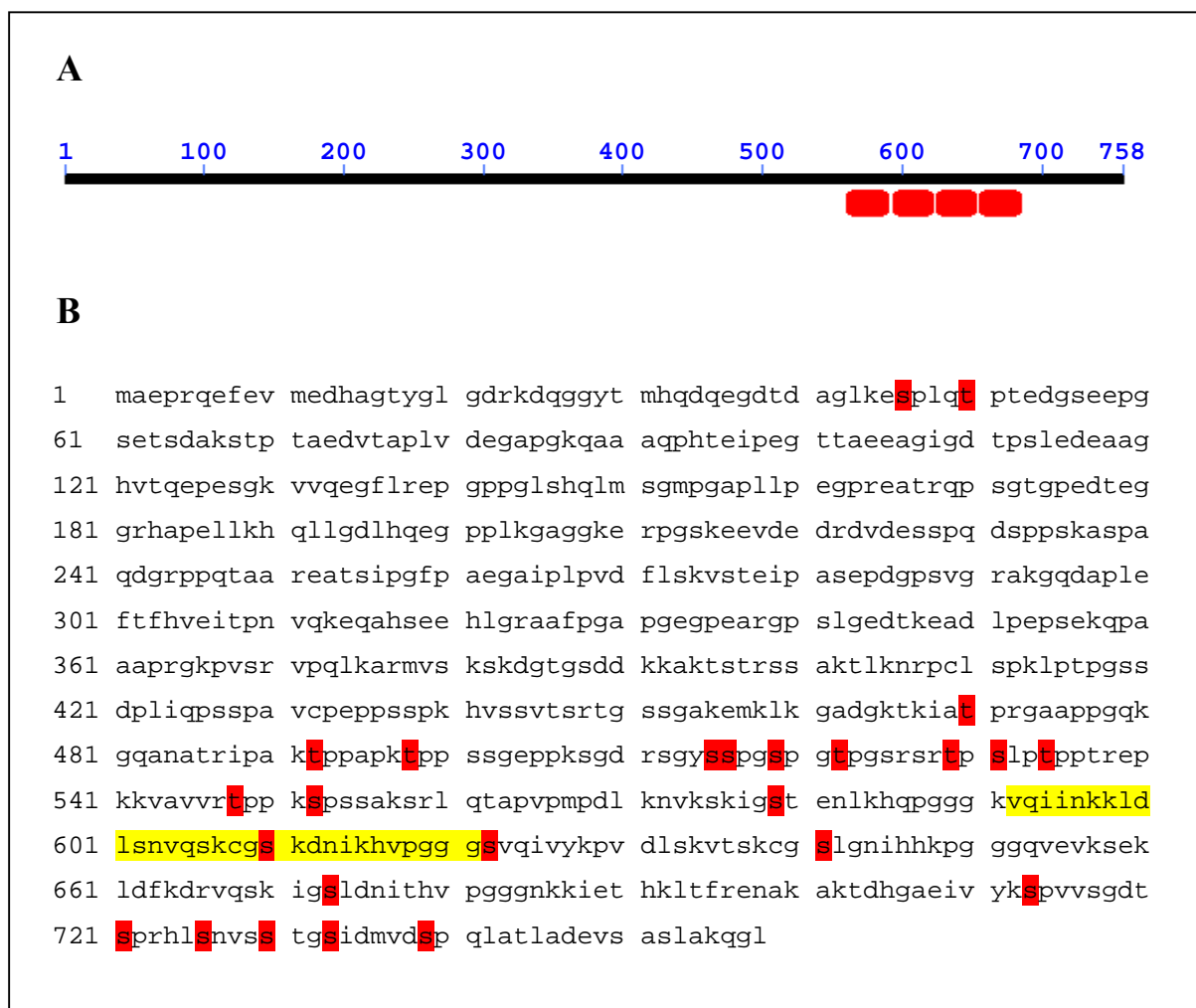


Abb. 39: Proteinsequenz des Mikrotubuli-assoziierten Proteins TAU

- Schematische Darstellung der Proteinsequenz des TAU-Proteins. Rote Rechtecke symbolisieren die Mikrotubuli-Bindungsrepeats. Der zweite Repeat stellt die Aminosäuren dar, die durch TAU Exon 10 kodiert werden.
- Proteinsequenz (PubMed: P10636). Die gelb unterlegten Aminosäuren charakterisieren die Proteinsequenz des alternativ gespleißten TAU Exon 10. Rot gekennzeichnete Symbole stellen Phosphorylierungsepitope dar. Die Serinresten S⁶¹⁰ und S⁶²² liegen innerhalb des alternativ gespleißten Exons.

ubiquitiniert und dass die Phosphorylierung unterschiedlicher Phosphoepitope entscheidenden Einfluss auf diesen Vorgang besitzen [187]. TAU besitzt mit den Serinresten S⁶¹⁰ und S⁶²² zwei Phosphorylierungsepitope in Exon 10 (Abb. 39), wodurch es unterschiedliche Phosphoisomere bilden kann. Dies stellt u. U. einen Hinweis auf eine abweichende Ubiquitinierung der zwei Isoformen dar. Das Verhältnis der TAU-Isoformen in den Ablagerungen muss dementsprechend nicht bindend die tatsächlichen Verhältnisse der Proteine widerspiegeln.

2.1.2 Okzipitalkortex und supplementärer Motokortex zeigten auf mRNA-Ebene keinen Unterschied

Ein Vergleich der Alzheimer-Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte weder im Okzipitalkortex noch im supplementären Motokortex signifikante Expressionsunterschiede bezüglich des Verhältnisses von tau Exon 10 Einschluss zu Ausschluss. Da beide Regionen zu denjenigen zählen, die von der Alzheimer-Erkrankung nicht oder erst sehr spät betroffen sind, unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass es sich bei der Fehlregulation des alternativen Spleißens von tau Exon 10 um einen für die Alzheimer-Demenz relevanten Prozess handelt, der entsprechend nur in den spezifisch betroffenen Regionen nachweisbar sein sollte, nicht aber in Kontrollregionen.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der Isoform tau +Exon 10 bei den AD-Gehirnen in den von der Alzheimer-Erkrankung betroffenen Regionen (präfrontaler und temporaler Kortex) im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht war. Im Gegensatz dazu war in den Kontrollregionen (Okzipitalkortex und supplementärer Motokortex) dieser Effekt nicht zu beobachten. Hiermit konnten die bereits veröffentlichten Daten von Yasojima et al. [202] bestätigt werden. Sie zeigten, dass tau +Exon 10 in den von der Alzheimer-Erkrankung stark betroffenen Regionen signifikant höher exprimiert war als in den nicht oder erst sehr spät betroffenen Regionen.

2.2 Expression von Htra2-β in Alzheimer-Gehirnen

SR-Proteine können durch Bindung an regulatorische Elemente auf der mRNA das konstitutive wie auch das alternative Spleißen in konzentrationsabhängiger Weise beeinflussen [140;141]. Für die Vollformenform des humanen Transformer hTRA2-β konnte bereits ein Einfluss auf das alternative Spleißen von tau Exon 10 nachgewiesen werden. Durch spezifische Bindung des humanen Transformer hTRA2-β an ein *cis*-Element innerhalb des tau Exons 10 kann in Abhängigkeit von der Stärke des Enhancers das alternative Spleißen

sowohl *in vitro* wie auch auf Zellkulturebene beeinflusst werden [158;189]. Die kürzere Isoform hTRA2-β3 führt dagegen in Zellkulturassays zu einem verstärkten Ausschluss von tau Exon 10 [158].

Interessant für uns war, ob in der AD möglicherweise ein pathologisch verändertes Verhältnis der beiden htra2-β Isoformen besteht. Eine Verschiebung könnte Einfluss auf das alternative Spleißen von tau Exon 10 besitzen und somit zu verstärkten Ablagerungen führen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene Unterschiede nachweisbar sind.

2.2.1 mRNA-Expression der htra2-β1 bzw. htra2-β3 Isoformen

In den von NFT-Bildung bei AD stark betroffenen Regionen, dem präfrontalen und temporalen Kortex, war das Verhältnis htra2-β1/htra2-β3 mRNA-Isoformen signifikant bzw. tendenziell verändert, wohingegen in den Kontrollregionen (supplementärer Motokortex und Okzipitalkortex) kein Unterschied auftrat.

Interessant war in diesem Zusammenhang, dass sich die Veränderungen in den beiden von NFT Bildung i.d.R. stark betroffenen Hirnregionen in zwei unterschiedliche Richtungen bewegten. Der präfrontale Kortex zeigte in den Alzheimer-Gehirnen eine signifikante Erniedrigung des Verhältnisses htra2-β1/htra2-β3, der Temporalkortex dagegen eine tendenzielle Erhöhung. Diesen Effekt können wir uns nicht erklären. Möglicherweise könnte dies auf ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher noch nicht definierter molekularer bzw. zelltyp- oder regionenspezifischer Faktoren zurückzuführen sein.

2.2.2 Proteinexpression der hTRA2-β1 bzw. hTRA2-β3 Isoformen

Nachdem wir auf mRNA-Ebene sowohl im präfrontalen als auch im temporalen Kortex eine Veränderung des htra2-β Isoformverhältnisses detektieren konnten, versuchten wir im nächsten Schritt mittels Western Blot beide Isoformen auf Proteinebene nachzuweisen.

Hier zeigte sich, dass die Isoform hTRA2-β3 im präfrontalen Kortex von Alzheimer-Gehirnen im Vergleich zu Kontrollen verstärkt nachweisbar war. Dies korreliert mit unseren Ergebnissen aus der mRNA-Untersuchung, denn dort war das Verhältnis htra2-β1/htra2-β3 erniedrigt, d.h. htra2-β3 relativ stärker bzw. htra2-β1 relativ weniger exprimiert. Interessanterweise konnte eine verstärkte Expression von hTRA2-β3 bereits in anderen Erkrankungen, die mit Hirnschädigung einhergehen, z. B. Ischämie oder Mikroinfarkte, nachgewiesen werden [190;191].

Im Temporalkortex dagegen zeigte sich im Gegensatz zur mRNA-Analyse kein signifikanter Unterschied. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre beispielsweise, dass hTRA2- β gewebespezifisch differenziell exprimiert wird [152], d.h. es bestehen nicht bekannte molekulare Unterschiede in den jeweiligen Hirnregionen, die sich unterschiedlich auf die Proteinexpression auswirken könnten.

In diesem Zusammenhang sind auch methodische Überlegungen zur Durchführung von Proteinexpressionsexperimenten aus *post mortem* Gewebe zu berücksichtigen, da unbekannte Faktoren, wie Dehydratation, hypoxische Verhältnisse, Verschiebung des pH-Werts im Gewebe oder Medikamenteneinnahme eine Veränderung der Proteinexpression bewirken können, sodass eine Replikation dieser Versuche erforderlich ist.

Die Untersuchung der Proteinexpression in einer Kontrollregion, dem okzipitalen Kortex, liefert wie auf mRNA-Ebene keine signifikant veränderten Werte für die unterschiedlichen Isoformen htra2- β 1 und htra2- β 3.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den gewählten Bedingungen die Isoform Htra- β 3 im präfrontalen Kortex von AD-Gehirnen im Vergleich zu Kontrollen sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene hochreguliert war, während die auf mRNA-Ebene detektierbare differentielle Expression im Temporalkortex nicht durch Western Blot Analyse bestätigt werden konnte. Die Kontrollregion zeigte weder in RT-PCR Experimenten noch im Western Blot eine signifikant veränderte Expression der Htra2- β Isoformen.

2.3 Das Expressionsmuster der Isoformen der Kinase clk2 ist verändert in Alzheimer-Gehirnen

Phosphorylierungsvorgänge spielen im Rahmen alternativer Spleißprozesse eine große Rolle. Sie sind an der Regulation der intranukleären Lokalisation von SR-Proteinen beteiligt [192] und haben durch Phosphorylierung von SR-Domänen Einfluss auf die Funktionalität und Verfügbarkeit der aktiven Konzentration dieser *trans*-Faktoren [193;194].

Im menschlichen Organismus konnten bis jetzt vier Vertreter der Clk-Kinasefamilie (Clk1-4) identifiziert werden [162], die zwar ubiquitär, aber dennoch zellspezifisch in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert werden [145]. Bedingt durch alternatives Spleißen kann neben der jeweils aktiven Vollängenform eine trunkierte, inaktive Isoform generiert werden, der die carboxyterminale Kinasedomäne fehlt [162].

In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass je höher die Konzentration an Clk-Kinasen ist, desto stärker wird der Einschluss von Exon 10 unterdrückt, wobei Clk2 im

Vergleich zu Clk1, 3 und 4 den stärksten Effekt auf das System besitzt. Dieser Einfluss erfolgt jedoch wahrscheinlich indirekt über andere Faktoren wie SR- oder SR-ähnliche Proteine (z.B. htra2- β), da SR-Protein-Kinasen selbst keine bekannten RNA-Bindungsmotive aufweisen [171].

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsversuche zeigten, dass in allen untersuchten Hirnregionen (präfrontaler und temporaler Kortex, sowie okzipitaler und supplementärer Motokortex) die Isoform der Kinase clk2, die für die aktive Kinasevariante kodiert (clk2 +Exon 4), in den Alzheimer-Gehirnen im Vergleich zu den Kontrollgehirnen verhältnismäßig geringer exprimiert war als die Isoform clk2 –Exon 4, der die Sequenz für die Kinasedomäne fehlt.

Da die verminderte relative Expression von clk +Exon 4 sich nicht auf die von AD betroffenen Hirnregionen beschränkte, sondern auch in den Kontrollregionen nachweisbar war, scheint es sich um einen regionenübergreifenden Effekt zu handeln. Unterstützt wird diese Annahme von der Tatsache, dass auch andere Kinasen bei dieser Erkrankung sowohl in betroffenen wie auch in Kontrollregionen abreguliert sind [195;196].

Auch wenn sich eine relativ verminderte Expression von clk +Exon 4 in allen untersuchten Hirnregionen feststellen lässt, kann dies nicht ohne weiteres auch auf seine Funktion und Auswirkung übertragen werden. Jedes Hirnareal zeichnet sich in Anpassung an die jeweilige Funktion durch das Auftreten ganz spezieller Proteine aus. Aufgrund dessen kann der Effekt der Kinase von Region zu Region - obwohl überall abreguliert - trotzdem unterschiedlich sein. Dies könnte u.U. dazu führen, dass die in allen Regionen vermindert exprimierte Isoform clk +Exon 4 im präfrontalen Kortex und Temporalkortex einen anderen Effekt ausüben könnte als im Okzipital- bzw. supplementären Motokortex.

2.4 Zusammenhang zwischen dem alternativen Spleißen von Tau, dem SR-ähnlichen Protein Htra2- β und der Kinase Clk2

Im folgenden soll überprüft werden, inwieweit obige Ergebnisse zum mRNA-Expressionsniveau verschiedener am alternativen Spleißen von Tau Exon 10 beteiligter Faktoren aus humanem *post mortem* Gewebe mit einem aus *in vitro* und Zellkulturexperimenten abgeleiteten hypothetischen Regulationskreislaufts übereinstimmen (Abb. 40) [158].

Dieser hypothetische Regulationskreislaufl geht davon aus, dass die SR-Protein Kinase CLK2 das Volllängenprotein hTRA2- β 1 an entsprechenden Phosphoepitopen phosphorylieren und dadurch aus seinen Speicherkompartimenten, den sog. *speckles*, freisetzen kann [158]. Durch

Bindung des moderat phosphorylierten hTRA2- β 1 Proteins an exonische Enhancersequenzen innerhalb von tau Exon 10 können alternative Spleißstellen erkannt werden, Exon 10 bleibt eingeschlossen, was in der Expression der Isoform Tau +Exon10 resultiert. Durch Hyperphosphorylierung können alternative Spleißstellen möglicherweise durch verringerte Bindungskapazität an Enhancersequenzen oder Sequestrierung des Enhancers nicht mehr erkannt werden [1;171]. Als Folge davon wird Exon 10 ausgeschlossen, was zur Bildung der Isoform tau –Exon 10 führt. Des Weiteren kann diese Hyperphosphorylierung zu einem veränderten Spleißmuster des Htra-Gens selber führen. Es wird vermehrt htra2- β 3 generiert [6]. Möglicherweise bedingt durch das Fehlen einer SR-Domäne kann diese nicht oder nur schwach an die Tau-mRNA binden. Dieser Hypothese folgend führt hTRA2- β 3 ebenso wie hyperphosphoryliertes hTRA2- β 1 zu einem verstärkten Ausschluss von Exon 10 und somit zur Bildung der Isoform tau –Exon 10.

Der in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Einschluss von tau Exon 10 in den betroffenen Hirnregionen (präfrontaler und temporaler Kortex) von Alzheimer-Patienten lässt sich anhand der oben dargestellten Hypothese folgendermaßen erklären:

Eine erhöhte Expression modulatorisch wirkender Spleißfaktoren, wie z.B. hTRA2- β 1, könnte einen verstärkten Einschluss von Exon 10 des Tau-Gens bewirken, wodurch verstärkt die 4R-Tau Isoformen generiert werden können. Eine verringerte Expression dieser Faktoren hätte entsprechend den gegenteiligen Effekt zur Folge, d.h. einen verminderten Einschluss von tau +Exon 10, und damit eine verstärkte 3R-Isoformtranslation.

Dieser hypothetische Mechanismus wird durch Befunde aus mRNA-Experimenten im Temporalkortex unterstützt. Hier konnte für Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollen eine Erhöhung der relativen Expression von htra2- β 1 beobachtet werden, die in Zellkulturexperimenten einen vermehrten Einschluss von Exon 10 des Tau-Gens bewirkt.

Die im präfrontalen Kortex detektierbare erhöhte relative Expression der htra2- β 3 Isoform, bzw. das verringerte Verhältnis der htra2- β 1/htra2- β 3 mRNA kann jedoch mit obigem Modell nicht erklärt werden. Möglicherweise spielen hier gewebe- oder regionenspezifische Faktoren eine Rolle, die das alternative Spleißen von Tau über noch unbekannte Mechanismen beeinflussen.

Bei der Betrachtung der clk-Isoformen ist zu sehen, dass in dieser Arbeit die Isoform clk2 +Exon 4, die für die phosphorylierungsaktive Isoform kodiert, auf mRNA-Ebene vermindert exprimiert wird. Es erscheint durchaus möglich, dass die moderate Phosphorylierung von hTRA2- β , die für die Funktion des trans-Faktors essentiell ist, stattfinden kann. Der indirekte Einfluss auf das alternative Spleißen von tau Exon 10 bliebe

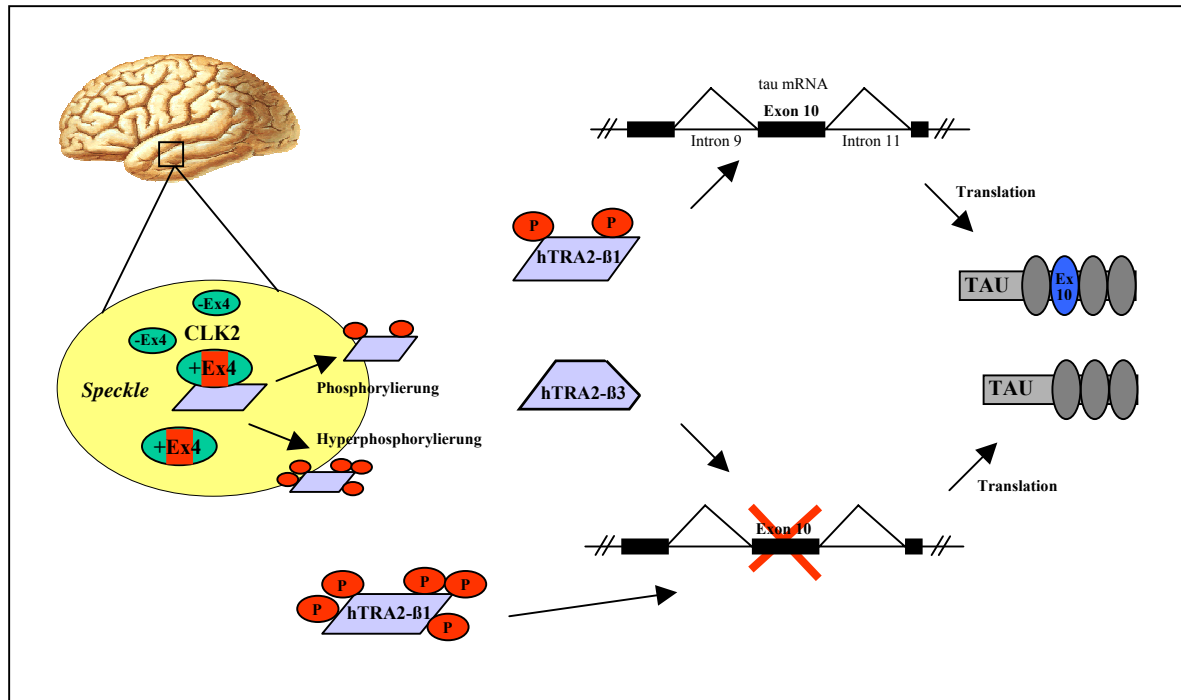


Abb. 40: Schematische Darstellung des hypothetischen Einflusses von CLK2 und hTRA2-β auf das alternative Spleißen von tau Exon 10

Phosphorylierung von hTRA2-β1 durch die Kinase CLK2 führt zur Freisetzung aus den Speicherkompartimenten (*speckles*). hTRA2-β1 kann an den exonischen Enhancer von Exons 10 der Tau prä-mRNA binden, Exon 10 wird vermehrt eingeschlossen, die 4R Isoformen verstärkt exprimiert. Hyperphosphorylierung von hTRA2-β1 verringert die Bindungskapazität an den exonischen Enhancer, Exon 10 wird verstärkt ausgeschlossen. Auch die verkürzte Isoform hTRA2-β3 kann nicht oder nicht effizient genug an die Enhancersequenz binden, Exon 10 wird verstärkt ausgeschlossen und die 3R-Tau Isoformen verstärkt gebildet. Eine Änderung des Verhältnisses der 3R/4R Tau Isoformen zueinander ist pathologisch.

bestehen und die 4R-Isoform kann generiert werden. Eine Hyperphosphorylierung von hTRA2-β ist dagegen unwahrscheinlich, sodass der Ausschluss von tau Exon 10 unter diesen Bedingungen nicht unterstützt werden würde. Das so entstehende Missverhältnis mit einem Überschuss an Exon 10 haltigen Tau Isoformen kann in betroffenen Regionen bei Alzheimer-Patienten beobachtet werden.

Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass sich Erkenntnisse, die auf Zellkulturebene gewonnen wurden, nicht ohne weiteres auf humanes Gewebe übertragen lassen. Zum einen wurden in den zugrunde liegenden Zellkulturexperimenten teilungsfähige Fibroblasten verwendet, wohingegen die Neuronen diese Fähigkeit nicht mehr besitzen. Zum anderen lassen sich Bedingungen in einem Zellkultursystem viel exakter definieren, einhalten und kontrollieren als es bei der Arbeit mit humanem *post mortem* Gewebe möglich ist. Hier können unterschiedlichste Faktoren Einfluss auf Vorgänge nehmen. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die CDC-ähnliche Kinase CLK2 als auch der humane Transformer hTRA2-β am alternativen Spleißen von Tau Exon 10 beteiligt sind. Im Hinblick

auf die Alzheimer-Erkrankung liefert diese Arbeit indirekte Hinweise darauf, dass Fehlregulationen innerhalb dieses Regelkreislauts daran beteiligt sein könnten.

2.5 Ansätze für eine kausale Therapie der Alzheimer-Erkrankung

Alle klassischen Antidementiva, die zur Zeit in der Alzheimer-Therapie eingesetzt werden, sind symptomorientiert, d.h. es kann lediglich eine Verbesserung der klinischen Symptomatik bewirkt bzw. die Progression der Krankheit verzögert werden. Eine Heilung ist auf diesem Weg nicht möglich.

2.5.1 Sekretasemodulatoren und Immunisierung

Neuere Therapieansätze versuchen an den möglichen Ursachen anzugreifen. So versucht man beispielsweise über Sekretasemodulatoren die Entstehung von A β -Ablagerungen zu verhindern oder bereits vorhandene Plaques wieder aufzulösen. Hierbei erscheint die Inhibition der β -Sekretase am erfolgversprechendsten [197]. Die erste Generation dieser Arzneimittel ist bereits entwickelt und wird auf ihre Wirksamkeit getestet. Einen weiteren Ansatzpunkt stellt die γ -Sekretase dar, durch deren proteolytische Aktivität das neurotoxische A β entstehen kann. Auch die kompetitive Hemmung der β -Sekretase durch Stimulation der α -Sekretase ist bereits in klinischer Testung. Sowohl passive wie auch aktive Immunisierung gegen A β sind in Erprobung [198]. Im Rahmen der aktiven Immunisierung sind schwerwiegende Entzündungsreaktionen des Gehirns aufgetreten, sodass Studien am Menschen vorübergehend eingestellt wurden mussten.

2.5.2 Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren

CDC-ähnlichen Kinasen sind maßgeblich an alternativen Spleißprozessen beteiligt. Sie können mittels Phosphorylierung SR-Proteine aus ihren Speicherkompartimenten freisetzen und durch Hyper- bzw. Hypophosphorylierung die Funktion dieser Proteine beeinflussen [145;146;163]. Durch Einflussnahme auf ihre Konzentration ist eine Modulation dieser Mechanismen denkbar. Erste therapeutische Ansätze sind bereits veröffentlicht. Sowohl Hyper- als auch Hypophosphorylierung von SR-Proteinen inhibiert alternatives Spleißen, d.h. durch Inhibition der SR-Protein Kinasen ist ein Einfluss auf fehlerhafte Spleißprozesse denkbar. Muraki et al. konnten nicht nur zeigen, dass das Benzothiazol-Derivat TG003 die Kinase-Aktivität von Clk1/Sty in Säugerzellen inhibiert, sondern ebenso, dass mit dieser Substanz Clk1/Sty-abhängige Spleißprozesse beeinflusst werden können [199]. Auf diesem

Weg wären Krankheiten, deren Fehlfunktion auf das Fehlen eines alternativ gespleißten Exons zurückzuführen ist, möglicherweise therapierbar.

Da es nicht möglich ist, Kinasen direkt zu stimulieren und so den Phosphorylierungsstatus und damit die Konzentration der aktiven SR-Proteine zu beeinflussen, wird überlegt, diesen Einfluss über eine Hemmung der Phosphatasen zu erreichen. Ein Einfluss von Phosphatase-Inhibitoren auf alternative Spleißprozesse konnte bereits nachgewiesen werden [200;201].

Theoretisch denkbar ist beispielsweise, dass durch spezifischen Phosphatasen Einfluss auf SR-Proteine genommen werden kann. Durch Hemmung dieser Enzyme könnte eine verstärkte Phosphorylierung der modulatorisch bzw. regulatorisch in Spleißprozesse eingreifenden Proteine bewirkt werden.

Die *post mortem* Untersuchungen dieser Arbeit konnten Ergebnisse von Yasojima et al. [202] bezüglich der erhöhten mRNA-Expression der Tau +Exon 10 Isoform in den für die Alzheimer-Erkrankung kritischen Regionen bestätigen. Es bietet sich daher an, den Einsatz spezifischer Phosphatase-Inhibitoren zu untersuchen. Diese könnten das potentielle Defizit an aktiven SR-Proteinkinasen, wie z.B. Clk2, indirekt kompensieren und so zu einer Revertierung des pathologisch veränderten Isoformenverhältnisses von Tau 3R/4R führen.

2.5.3 SR-Protein Modulatoren

Auch über eine direkte Beeinflussung der Konzentration von SR-Proteinen ist ein Eingriff in alternative Spleißprozesse möglich. Am Beispiel der spinalen Muskelatrophie (SMA) konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass es möglich ist, den Einschluss von SMN2 Exon 7 zu stimulieren [203;204]. SMA-Patienten, bei denen eine homozygote Deletion von SMN1 vorliegt, sind Träger von mindestens einer Kopie des SMN2-Gens. Außer in ihrem Spleißverhalten unterscheiden sich SMN1 und SMN2 nicht wesentlich. Bedingt durch eine stille Mutation in Exon 7 des SMN2-Gens wird nicht nur eine exonische Enhancersequenz zerstört [205;206], sondern gleichzeitig eine Silencersequenz für hnRNP A1 generiert [207]. Dies führt zur verstärkten Expression eines Transkripts, das für ein trunkiertes Protein kodiert, das biochemisch instabil und nicht fähig ist, die fehlende SMN1 Form zu kompensieren [208]. Durch verstärkten Einschluss von SMN2 Exon 7 könnte das Fehlen des Protein SMN1 kompensiert werden. Für die Substanzen Natriumbutyrat [209], Valproinsäure [203;210] und Alcarubizin [211] konnte bereits eine Stimulation des Einschlusses von SMN2 Exon 7 nachgewiesen werden. Ein analoges Verfahren, dass den Ausschluss von Exon 10 bedingen würde, wäre auch bei der Alzheimer-Erkrankung denkbar.

2.5.4 Gentherapeutische Ansätze

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen Spleißdefekten und den Ursachen der Alzheimer-Erkrankung besteht. Jüngere Veröffentlichungen sprechen Fehlregulationen alternativer Spleißprozesse einen Einfluss auf die Mitentstehung der Alzheimer-Erkrankung zu. Beispielsweise konnten Spleißfehler bei der Prozessierung der Glykogen Synthase Kinase 3-BETA (GSK-3 β) [212] und des Hydroxymethyl-glutaryl-Coenzym A1a (HMGCoA1a) mit AD in Verbindung gebracht werden [213].

Sich in Erprobung befindende genspezifische Therapien greifen i.d.R. auf der Transkriptionsebene an. Zum einen werden in diesem Zusammenhang komplementäre Oligonukleotide [214], zum anderen die Exon-spezifischen siRNAs (*small interfering RNAs*) [215] diskutiert, erste Erfolge wurden bereits erzielt [216-218]. So könnten sich Spleißfehler, die durch Mutationen verursacht wurden, korrigieren lassen wie *ex vivo* Experimente am Beispiel der β -Thalassämie [219] und auch der FTDP-17 [220] bereits zeigen konnten. Eine andere Einsatzmöglichkeit der Oligonukleotide liegt im Bereich der Modifikation von Spleißmustern und somit einer Verschiebung des Verhältnisses einzelner Isoformen zueinander.

In dieser Arbeit konnte in Alzheimer-Gehirnen ein möglicherweise durch Fehlregulation des alternativen Spleißprozesses ausgelöstes Missverhältnis der Tau Exon 10 Isoformen nachgewiesen werden, das ein pathologisch verändertes Verhältnis der Isoformen 3R/4R zur Folge haben könnte. Ein Oligonukleotid, das spezifisch den Einschluss von Tau Exon 10 unterdrückt, wäre möglicherweise in der Lage dieses Missverhältnis zu beheben.

Sollte es möglich sein, Fehlregulationen im Bereich des alternativen Spleißens bereits auf Transkriptionsebene entgegenzuwirken, könnte dies auch für die Therapie der Alzheimer-Erkrankung einen neuen Ansatzpunkt bedeuten. Abgesehen von der großen gesundheitsökonomischen Relevanz, wird sowohl von jedem einzelnen Patienten wie auch von deren Angehörigen erheblicher Leidensdruck genommen. Auch eine Heilung der Alzheimer-Erkrankung wäre so denkbar.

3 Abkürzungen und Fachbegriffe

Abkürzung	Erklärung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer-Erkrankung
Ak	Antikörper
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (<i>amyloid precursor protein</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	<i>beta-site cleaving enzyme</i>
Blot	Transfer
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C- Terminus	Carboxy- Ende
CBD	Kortikobasale Demenz
cDNA	komplementäre DNA
Clk2	CDC-ähnliche Kinase 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
df	Freiheitsgrad (<i>degrees of freedom</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FTDP-17	Fronttemporale Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt an Chromosom 17
G	Guanin
H ₂ O	Wasser
hnRNP	heteronukläres Ribonukleinprotein (<i>heteronuclear ribonucleoprotein</i>)

Abkürzung	Erklärung
Htra2-β	humaner Transformer2-beta
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
min	Minute
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MSTD	Multisystem-Tauopathie mit präseniler Demenz
MT	Mikrotubuli
MW	Mittelwert
N-Terminus	Amino-Ende
NF	Neuropilfäden
NFT	Neurofibrilläre Bündel (<i>neurofibrillary tangles</i>)
nt	Nukleotide
p	Signifikanz, p-Wert
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSP	Supranukleäre Blickparese
Primer	DNA-Oligonukleotid
RLT-Puffer	<i>RNA Lysis Tissue</i> (Guadinium- Isothiocyanat haltiger Puffer)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolution per minute</i>)
RRM	RNA Erkennungsmotiv
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
RW-Puffer	RNA Waschpuffer
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzung	Erklärung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF	gerade Filamente
snRNP	kleines nukleäres Ribonukleinprotein (<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>)
SR-Protein	Serin-Arginin-reiches Protein
Superscript™	RNase H ⁻ Reverse Transkriptase
T	Thymin
Taq	thermostabile Polymerase (<i>Thermus aquaticus</i>)
TBE	Tris-Borat-Na ₂ EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tra	Transformer
U	Uracil
UV	Ultraviolett

4 Literaturverzeichnis

1. Stoilov P. Regulation of alternative splicing by human transformer-2-beta, 2002.
2. Alberts B., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J.D., Molecular Biology of the cell 1994.
3. Braak H. and Braak E., Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol*, 82 (1991) 239-259.
4. Padberg F., Möller H.J., Stübner S., Boetsch T., and Hampel H., *Medizinische Welt*, (1999) 105-113.
5. Mandelkow E.M. and Mandelkow E., Tau in Alzheimer's disease, *Trends Cell Biol*, 8 (1998) 425-427.
6. Stoilov P., Daoud R., Nayler O., and Sasm S., Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA, *Human Molecular Genetics*, 13 (2004) 509-524.
7. Gustke N., Trinczek B., Biernat J., Mandelkow E.M., and Mandelkow E., Domains of tau protein and interactions with microtubules, *Biochemistry*, 33 (1994) 9511-9522.
8. Braak E., Braak H., and Mandelkow E.M., A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads, *Acta Neuropathol*, 87 (1994) 554-567.
9. Spillantini M.G. and Goedert M., Tau protein pathology in neurodegenerative diseases, *Trends Neurosci*, 21 (1998) 428-433.
10. Buée L., Bussiére T., Buée-Scherrer V., Delacourte A., and Hof P.H., Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders, *Brain Research Reviews*, 33 (2000) 95-130.
11. Stoss O., Stoilov P., Daoud R., Hartmann A.M., Olbrich M., and Stamm S., Misregulation of pre-mRNA splicing that causes human diseases, *Gene Ther Mol Biol*, 5 (2000) 9-28.
12. Möller H.J., *Psychiatrie und Psychotherapie* 2001, 185 pp.
13. Förstl H., *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie* 1999.
14. Leung G.M., Yeung, R.Y.T., Chi, I., and Chu, L.W., The Economics of Alzheimer Disease, *Dementia of Geriatric Cognitive Disorders*, (2002) 34-43.
15. Katzmann R., The prevalence and malignancy of Alzheimer disease. A major killer, *Arch Neurol*, 33 (2004) 218.
16. Leung G.M., Yeung, R.Y.T., Chi, I., and Chu, L.W., The Economics of Alzheimer Disease, *Dementia of Geriatric Cognitive Disorders*, (2002) 34-43.
17. Alzheimer A., Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie*, 64 (1907) 146-148.
18. Hardy J., Molecular genetics of Alzheimer's disease, *Acta Neurol Scand Suppl*, 165 (1996) 13-17.
19. Kurz A., Demenz. In: Möller H.-J., Laux G., Kapfhammer H.-P. (Ed.), *Psychiatrie und Psychotherapie*, Springer, 2002, pp. 852-894.
20. Ehrhardt T. and Plattner A., *Verhaltenstherapie bei Morbus Alzheimer*, Horgrefe, Göttingen, 1999.
21. Morishima-Kawashima M. and Ihara Y., Alzheimer's Disease: β -Amyloid Protein and Tau, *Journal of Neuroscience Research*, (2002) 392-401.
22. Selkoe D.J., Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, *Nature*, (1999) A23-A31.

23. Yamaguchi H., Maat-Schiemann M.L.C., Van Duinen S.G., Prins F.A., Neeskens P., Natte R., and Roos R.A.C., Amyloid- β protein (A β) starts to deposit as plasma membrane-bound form to diffuse plaques of brains from hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type, Alzheimer disease and nondemented aged subjects, *J Neuropathol Exp Neurol*, (2003) 723-732.
24. Simons M. and Keller P., Die Alzheimer Krankheit - von den molekularen Mechanismen zu potentiellen Therapien, *Neuroforum*, 3 (2001).
25. De Strooper B. and Annaert W., Proteolytic processing and cell biological functions of the Amyloid protein, *J Cell Sci*, 113 (2000) 1857-1870.
26. Jellinger K.A., Neuropathologie der Demenzen, *J Neurol Neurochir Psychiatr*, 1 (2001) 7-31.
27. Thal D., Rüb U., Schulz C., Sassin I., Ghebremedhin E., Tredici K., Braak E., and Braak H., Sequence of A β -protein deposition in the human medial temporal lobe, *J Neuropathol Exp Neurol*, 59 (2000) 733-748.
28. Thal D.R., Arendt T., Waldmann G., Holzer M., Zedlick D., and Rüb U., Progression of neurofibrillary changes and PHF-tau in end stage Alzheimer's disease is different from plaque and neuroglial pathology, *Neurobiology of Aging*, 19 (1998) 517-525.
29. Hardy J. and Selkoe D.J., The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road of Therapeutics, *Science's Compass*, 297 (2002) 353-356.
30. Braak H. Braak E., Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease, *Acta Neurologica Scandinavica*, Supplement 165 (1996) 3-12.
31. Schultz C., Braak E., and Braak H., Abnorme Phosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins im Zentralnervensystem, *Neuroforum*, 02 (2001) 57-67.
32. Tolney M. and Probst A., Tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 25 (1999) 171-187.
33. Brancher C., Brunner C., and L.H., Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Brain Res*, 477 (1989) 90-99.
34. Braak H. Braak E., Staging of Alzheimer's Disease-Related Neurofibrillary Changes, *Neurobiology of Aging*, 16 (1995) 271-284.
35. Iraizoz I., Gutjarro J.L., Gonzalo L.M., and de Lacalle S., Neuropathological changes in the nucleus basalis correlated with clinical measures of dementia, *Acta Neuropathol*, 98 (1999) 186-196.
36. Geula C., Mesulam M.M., Saroff D.M., and Wu C-K., Relationship between plaques, tangles, and loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease, *Neuropathol Exp Neurol*, 57 (1998) 63-75.
37. Francis P.T., Palmer A.M., Snape M., and Wilcock G.W., The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease; a review of progress, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66 (1999) 137-147.
38. Weingarten M.D., Suter M.M., Littman D.R., and Kirschner M.W., Properties of the depolymerization products of microtubules from mammalian brain, *Biochemistry*, 13 (1974) 5529-5537.
39. Lee V.M.-Y., Goedert M., and Trojanowski J., Neurodegenerative Tauopathies, *Annu. Rev. Neurosci.*, 24 (2001) 1121-1159.
40. Schweers O., Schonbrunn-Hanebeck E., Marx A., and Mandelkow E., Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure, *J Biol Chem*, 269 (1994) 24290-24297.
41. Weingarten M.D., Lockwood A.H., Hwo S.Y., and Kirschner M.W., A protein factor essential for microtubule assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72 (1975) 1858-1862.

42. McDermott J.B., Aamodt S., and Aamodt E., *ptl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene whose products are homologous to the tau microtubule-associated proteins, *Biochemistry*, 35 (1996) 9415-9423.
43. Cambiazo V., Gonzales M., and Maccioni R.B., DMAP-85: A tau-like protein from *Drosophila melanogaster* larvae, *J. Neurochem.*, 64 (1995) 1288-1297.
44. Irminger-Finger I., Laymon R.A., and Goldstein L.S., Analysis of the primary sequence and microtubule-binding region of the *Drosophila* 205K MAP, *J. Cell Biol.*, 111 (1990) 2563-2572.
45. Liu Y., Xia J., Ma D., Faber D.S., and Fischer I., Tau-like proteins in the nervous system of goldfish, *Neurochem. Res.*, 22 (1997) 1511-1516.
46. Yin H.S., Chou H.C., and Chiu M.M., Changes in the microtubule proteins in the developing and transected spinal cords of the bullfrog tadpole: induction of microtubule-associated protein 2C and enhanced levels of Tau and tubulin in regenerating central axons, *Neuroscience*, 67 (1995) 763-775.
47. Kosik K.S. and Finch E.A., MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum, *J Neurosci*, 7 (1987) 3142-3153.
48. Lee G., Cowan N., and Kirschner M., The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain, *Science*, 239 (1988) 285-288.
49. Nelson P.T., Stefansson K., Gulcher J., and Saper C.B., Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, 67 (1996) 1622-1632.
50. Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., and Crowther R.A., Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequence and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *Neuron*, 3 (1989) 519-526.
51. Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.C., Ulrich J., and Crowther R.A., Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain, *EMBO J*, 8 (1989) 393-399.
52. Schoenfeld T.A. and Obar R.A., Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system, *Int Rev Cytol*, 151 (1994) 67-137.
53. Tucker R.P., The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis, *Brain Research Reviews*, 15 (1990) 101-120.
54. LoPesti P., Szuchet S., Papasozomenos S.C., Zinkowski R.P., and Binder L.I., Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 10369-10373.
55. Trinczek B., Ebeneth A., Mandelkow E.M., and Mandelkow E., Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles, *J Cell Sci*, 112 (1999) 2355-2367.
56. Caceres A. and Kosik K.S., Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons, *Nature*, 343 (1990) 461-463.
57. Drewes G., Ebeneth A., and Mandelkow E.M., MAPs, MARKs and microtubule dynamics, *Trends Biochem. Sci.*, 23 (1998) 307-311.
58. Mitchison T. and Kirschner M.W., Dynamic instability of microtubule growth, *Nature*, 312 (1984) 237-242.
59. Cleveland D.W., Hwo S.Y., and Kirschner M.W., Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly, *J Mol Biol*, 116 (1977) 227-247.
60. Drewes G., Ebeneth A., Preuss U., Mandelkow E.M., and Mandelkow E., MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption, *Cell*, 89 (1997) 297-308.

61. Goldstein L.S. and Gunawardena S., Flying through the *Drosophila* cytoskeletal genome, *J Cell Biol*, 150 (2000) F63-F68.
62. Noble W., Olm V., Takata K., Casey E. Mary O., Meyerson J., Gaynor K., LaFrancois J., Wang L., Kondo T., Davies P., Burns M., Veeranna., Nixon R., Dickson D., Matsuoka Y., Ahljianian M., Lau L.F., and Duff K., Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo, *Neuron*, 38 (2003) 555-565.
63. Garcia M.L. and Cleveland D.W., Going new places using an old MAP: tau, microtubule and human neurodegenerative disease, *Curr Opin Cell Biol*, 13 (2001) 41-48.
64. Crowther R.A. and Goedert M., Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases, *J Struct Biol*, 130 (2000) 271-279.
65. Ozer R.S. and Halpain S., Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton, *Cell*, 11 (2000) 3573-3587.
66. Himmler A., Drechsel D., Kirschner M.W., and Martin Jr. D.W., Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains, *Mol. Cell. Biol.*, 9 (1989) 1381-1388.
67. Goode B.L., Chau M., Denis P.E., and Feinstein S.C., Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease., *J Biol Chem*, 275 (2000) 38182-38189.
68. Butner K.A. and Kirschner M.W., Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites, *J Cell Biol*, 115 (1991) 717-730.
69. Goedert M. and Jakes R., Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerisation, *EMBO J*, 9 (1990) 4225-4230.
70. Lee G., Neve R.L., and Kosik K.S., The microtubule binding domain of tau protein, *Neuron*, 2 (1989) 1615-1624.
71. Gustke N., Trinczek B., Biernat J., Mandelkow E.M., and Mandelkow E., Domains of tau protein and interactions with microtubules, *Biochemistry*, 33 (1994) 9511-9522.
72. Al-Bassam J., Ozer R.S., Safer D., Halpain S., and Milligan R.A., MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments, *J Cell Biol*, 157 (2002) 1187-1196.
73. Ichihara K., Kitazawa H., Iguchi Y., Hotani H., and Itoh T.J., Visualization of the stop of microtubule depolymerization that occurs at the high-density region of microtubule-associated protein 2 (MAP2), *J Mol Biol*, (2001) 107-118.
74. Wille H., Drewes G., Biernat J., Mandelkow E.M., and Mandelkow E., Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro *J Cell Biol*, 118 (1992) 573-584.
75. Steiner B., Mandelkow E.-M., Biernat J., Gustke N., Meyer H.E., Schmidt B., Mieskes G., Söling H.D., Drechsel D., Kirschner M.W., Goedert M., and Mandelkow E., Phosphorylation of microtubule associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺(+) -calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles, *EMBO J*, 9 (1990) 3539-3544.
76. Hirokawa N., Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method, *J Cell Biol*, 94 (1982) 129-142.
77. Chen J., Kanai Y., Cowan N.J., and Hirokawa N., Projection domains of MAP2 and tau determing spacing between microtubules in dendrits and axons, *Nature*, 360 (1992) 674-677.
78. Andreadis A., Brown W.M., and Kosik K.S., Structure and novel exons of the human tau gene, *Biochemistry*, 31 (1992) 10626-10633.

79. Georgieff I.S., Liem R.K., Couchie D., Mavilia C., Nunez J., and Shelanski M.L., Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems, *J Cell Sci*, 105 (1993) 729-737.
80. Brandt R., Léger J., and Lee G., Interaction of Tau with the Neural Plasma Membrane Mediated by Tau's Amino-terminal Projection Domain, *J Cell Biol*, 131 (1995) 1327-1340.
81. Esmali-Azad B., McCarty J.H., and Feinstein S.C., Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability, *J Cell Sci*, 107 (1994) 869-879.
82. Drubin D.G., Feinstein S.C., Shooter E.M., and Kirschner M.W., Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors, *J Cell Biol*, 101 (1985) 1799-1807.
83. Drechsel D.N., Hyman A.A., Cobb M.H., and Kirschner M.W., Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau, *Mol Biol Cell*, 3 (1992) 1141-1154.
84. Trinczek B., Biernat J., Baumann K., Mandelkow E.M., and Mandelkow E., Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules, *Mol Biol Cell*, 6 (1995) 1887-1902.
85. Panda D., Goode B.L., Feinstein S.C., and Wilson L., Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau, *Biochemistry*, 34 (1995) 11117-11127.
86. Mandelkow E.M., Drewes G., Biernat J., Gustke N., Van Lint J., Vandenheede J.R., and Mandelkow E., Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau, *FEBS Lett.*, 314 (1992) 315-321.
87. Neve R.L., Harris P., Kosik K.S., Kurnit D.M., and Donlon T.A., Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2, *Brain Res*, 387 (1986) 271-280.
88. Andreadis A., Kosik K.S., and Broderick J.A., Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons, *Nucleic Acids Res*, 23 (1995) 3585-3593.
89. Kosik K.S., Orecchio L.D., Bakalis S., and Neve R.L., Developmentally regulated expression of specific tau sequences, *Neuron*, 2 (1989) 1389-1397.
90. Schmid M.B., Structure and function of the bacterial chromosome, *Trends Biochem. Sci.*, 13 (1988) 131-135.
91. Nevins J.R., The pathway of eukaryotic mRNA formation, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 52 (1983) 466.
92. Lamond A.I., The spliceosome, *Bioessays*, 15 (1993) 595-603.
93. Quelle D.E., Zindy F., Ashmun R.A., and Sherr C.J., Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest, *Cell*, 83 (1995) 993-1000.
94. Black D.L., Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology, *Cell*, 103 (2000) 367-370.
95. Cáceres J.F. and Kornblihtt A.R., Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease, *Trends Genet.*, 18 (2002) 186-193.
96. Goldstrohm A.C., Greenleaf A.L., and Garcia-Blanco M.A., Co-transcriptional splicing of pre-mRNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing, *Gene*, 277 (2001) 31-47.
97. Graveley B.R., Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world, *Trends Genet.*, 17 (2001) 100-107.

98. Gautheret D., Poirot O., Lopez F., Audic S., and Claverie J.M., Alternate polyadenylation in human mRNAs: a large-scale analysis by EST clustering, *Genome Res.*, 8 (1998) 524-530.
99. Keegan L.P., Gallo A., and O'Connell M.A., The many roles of an RNA editor, *Neurochem. Res.*, 2 (2001) 869-878.
100. Banks R.E., Dunn M.J., Hochstrasser D.F., Sanchez J.-C., Blackstock W., Pappin D.J., and Selby P.J., Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities, *Lancet*, 356 (2000) 1749-1756.
101. Hide W.A., Babenko V.N., van Heusden P.A., Seoighe C., and Kelso J.F., The contribution of exon-skipping events on chromosome 22 to protein coding diversity, *Genome Res.*, 11 (2001) 1848-1853.
102. Modrek B., Resch A., Grasso C., and Lee C., Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes, *Nucleic Acids Res.*, 29 (2001) 2850-2859.
103. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Szustakowski J, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409 (2001) 860-921.

104. Harrison P.M., Kumar A., Lang N., Snyder M., and Gerstein M., A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it, *Nucleic Acids Res*, 30 (2002) 1083-1090.
105. Hodges P.E., Carrico P.M., Hogan J.D., O'Neill K.E., Owen J.J., Mangan M., Davis B.P., Brooks J.E., and Garrels J.I., Annotating the human proteome: the Human Proteome Survey Database (HumanPSD) and an in-depth target database for G protein-coupled receptors (GPCR-PD) from Incyte Genomics, *Nucleic Acids Res*, 30 (2002) 137-141.
106. Eissa N.T., Strauss A.J., Haggerty C.M., Choo E.K., Chu S.C., and Moss J., Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA, tissue-specific regulation and induction by cytokines, *J Biol Chem*, 271 (1996) 27184-27187.
107. Duncan P.I., Howell B.W., Marius R.M., Drmanic S., Douville E.M., and Bell J.C., Alternative splicing of STY, a nuclear dual specificity kinase, *J Biol Chem*, 270 (1995) 21524-21531.
108. Strohmaier C., Carter B.D., Urfer R., Barde Y.A., and Dechant G., A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor, *EMBO J*, 15 (1996) 3332-3337.
109. Courty Y., Rosinski-Chupin I., and Rougeon F., Various transcripts are generated from the VCSA1 gene by alternative splicing and poly(A) processing in the rat submandibular gland, *Gene*, 162 (1995) 291-296.
110. Kuhse J., Kuryatov A., Maulet Y., Malosio M.L., Schmieden V., and Betz H., Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor, *FEBS Lett.*, 283 (1991) 73-77.
111. Thanaraj T.A. and Stamm S., Prediction and statistical analysis of alternatively spliced exons, *Prog Mol Subcell Biol*, 31 (2003) 1-31.
112. Zhou Z., Licklider L.J., Gygl S.P., and Reed R., Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome, *Letters to nature*, 419 (2002) 182-185.
113. Graveley B.R., Sorting out the complexity of SR protein functions, *RNA*, 6 (2000) 1197-1211.
114. Manley J.L. and Tacke R., SR proteins and splicing control, *Genes Dev*, 10 (1996) 1569-1579.
115. Smith C.W., Valcarel J., Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control, *Trends Biochem. Sci.*, 25 (2000) 388.
116. Weighardt F., Biamonti G., and Riva S., The role of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism, *Bioessays*, 18 (1996) 747-756.
117. Dreyfuss G., Matunis M.J., Manol-Roma S., and Burd C.G., hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA, *Genomics*, 53 (1993) 191-202.
118. Maniatis T. and Reed R., The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in the pre-mRNA splicing, *Nature*, 325 (1987) 673-678.
119. Reed R., Griffith J., and Maniatis T., Purification and visualization of native spliceosomes, *Cell*, 53 (1988) 949-961.
120. Will C.L. and Luhrmann R., Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13 (2001) 290-301.
121. McCracken S., Fong N., Yankulov K., Ballantyne S., Pan G., Greenblatt J., Patterson S.D., Wickens M., and Bently D.L., The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcript, *Nature*, 385 (1997) 357-361.
122. Misteli T.J., *Cell Sci*, 113 (2000) 1841-1849.
123. Smith C.W. and Valcarel J., Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control, *Trends Biochem. Sci.*, 25 (2000) 381-388.
124. Berget S.M., Exon recognition in vertebrate splicing, *J Biol Chem*, 270 (1995) 2411-2414.

125. Burset M., Seledtsov I.A., and Solovyev V.V., Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genome, *Nucleic Acids Res*, 28 (2000) 4364-4375.
126. Green M.R., Biochemical mechanisms of the constitutive and regulated pre-mRNA splicing, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7 (1991) 559-599.
127. MacMillan A.M., Query C.C., Allerson C.R., Chen S., Verdine G.L., and Sharp P.A., Dynamic association of proteins with the pre-mRNA branch region, *Genes Dev.*, 8 (1994) 3008-3020.
128. Ladd A.N. and Cooper T.A., Findig signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era, *Genome Biol*, 3 (2002).
129. Blencowe B.J., Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases, *Trends Biochem. Sci.*, 25 (2000) 106-110.
130. Dreyfuss G., Kim V.N., and Kataoka N., Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (2002) 195-205.
131. Reed R. and Maniatis T., Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing, *Cell*, 41 (1985) 95-105.
132. Sharp P.A., Splicing of mRNA precursors, *Science*, 235 (1987) 771.
133. Fu X.D., The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors, *RNA*, 1 (1995) 663-680.
134. Mayeda A., Zahler A.M., Krainer A.R., and Roth M.B., Two members of a conserved family of nuclear phosphoproteins are involved in pre-mRNA splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992) 1301-1304.
135. Zahler A.M., Purification of SR protein splicing factors, *Methodes Mol Biol*, 118 (1999) 419-432.
136. Ge H. and Manley J.L., A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA, *Cell*, 62 (1990) 25-34.
137. Wu J.Y. and Maniatis T., Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing, *Cell*, 75 (1993) 1061-1070.
138. Tacke R. and Manley J.L., Determinants of SR protein specificity, *Curr Opin Cell Biol*, 11 (1999) 358-362.
139. Valcárel J. and Green M.R., The SR protein family: Pleiotropic functions in pre-mRNA splicing, *Trends Biochem. Sci.*, 21 (1996) 296-301.
140. Gao Q.-S., Memmott J., Lafyatis R., Stamm S., Screaton G., and Andreadis A., Complex Regulation of Tau Exon 10, Whose Missplicing Causes Frontotemporal Dementia, *J. Neurochem.*, 74 (2000) 490-500.
141. Sarkissian M., Winne A., and Lafyatis R., The mammalian homolog of suppressor-of-white-apricot regulates alternative messenger-rna splicing of cd45-4 and fibronectin IIICS, *J Biol Chem*, 271 (1996) 31106-31334.
142. Cowper A.E., Caceres J.F., Mayeda A., and Screaton G.R., Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alterative splicing, *J Biol Chem*, 276 (2001) 48914.
143. Tacke R., Tohyama M., Ogawa S., and Manley J.L., Human Tra2 proteins are sequence-specific activators of pre-mRNA splicing, *Cell*, 93 (1998) 139-148.
144. Kramer A., The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing, *Annu. Rev. Biochem.*, 65 (1996) 367-409.
145. Nayler O., Stamm S., and Ullrich A., Characterisation and comparison of four SR protein kinases, *Biochem J*, 326 (1997) 693-700.
146. Colwill K., Pawson T., Andrews B., Prasad J., Manley J.L., Bell J.C., and Duncan P.I., The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution, *EMBO J*, 15 (1996) 265-275.
147. Baker B.S., Sex in flies: the splice of life, *Nature*, 340 (1989) 521-524.

148. Baker B.S. and Wolfner M.F., A molecular analysis of *doublesex*, a bifunctional gene that controls both male and female sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*, *Genes Dev*, 2 (1988) 477-489.
149. Burtis K.C. and Baker B.S., *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides, *Cell*, 56 (1989) 997-1010.
150. Dauwalder B., Amaya-Manzanares F., and Mattox W., A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor transformer-2 has conserved splicing regulatory functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 9004-9009.
151. Beil B., Screaton G., and Stamm S., Molecular cloning of htra2-beta-1 and htra2-beta-2, two human homologs of tra-2 generated by alternative splicing, *DNA Cell Biol*, 16 (1997) 679-690.
152. Nayler O., Cap C., and Stamm S., Human Transformer-2-beta Gene (SFRS10): Complete Nucleotide Sequence, Chromosomal Localization, and Generation of a Tissue-Specific Isoform, *Genomics*, 53 (1998) 191-202.
153. Yamada T., Goto I., and Sakaki Y., Neuron-specific splicing of the Alzheimer amyloid precursor protein gene in a mini-gene system, *Biochem Biophys Res Commun*, 195 (1993) 442-448.
154. Stoilov P. and Daoud R., Nayler O., and Stamm S., Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA, *Human Molecular Genetics*, 13 (2004) 509-524.
155. Matsuo N., Ogawa S., Imai Y., Takagi T., Tohyama M., Stern D., and Wanaka A., Cloning of novel RNA binding polypeptide (RA301) induced by hypoxia/reoxygenation, *J Biol Chem*, 270 (1995) 28216-28222.
156. Segade F., Claudio E., Wrobel K., Ramos S., and Lazo P.S., Isolation of nine gene sequences induced by silica in murine macrophages, *J Immunol*, 154 (1995) 2384-2392.
157. Tsukamoto Y., Matsuo N., Ozawa K., Hori O., Higashi T., Nishizaki J., Tohnai N., Nagata I., Kawano K., Yutani C., Hirota S., Kitamura Y., Stern D.M., and Ogawa S., Expression of a novel RNA-splicing factor, RA301/Tra2beta, in vascular lesions and its role in smooth muscle cell proliferation, *Am J Pathol*, 158 (2001) 1685-1694.
158. Hartmann A.M. Regulation des alternativen Spleißens von Tau Exon 10 durch Phosphorylierung von Spleißfaktoren, 2003.
159. Colwill K., Feng L.L., Yeakley L.M., Gish G.D., Caceres J.F., Pawson T., and Fu X.D., SPRK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors, *J Biol Chem*, 271 (1996) 24569-24575.
160. Wang H.Y., Arden K.C., Bermingham J.R.Jr., Viars C.S., Lin W., Boyer A.D., and Fu X.D., Localization of serine kinases, SRPK1 (SFRSK1) and SRPK2 (SFRSK2), specific for the SR family of splicing factors in mouse and human chromosomes, *Genomics*, 57 (1999) 310-315.
161. Nayler O., Schnorrer F., Stamm S., and Ullrich A., The cellular localization of the murine serine/arginine-rich protein kinase Clk2 is regulated by serine 141 autophosphorylation, *J Biol Chem*, 273 (1998) 34341-34348.
162. von der Hanes J., Klaudiny J., and Scheit K.H., Characterization by cDNA cloning of two new human protein kinases, *J Mol Biol*, 244 (1994) 665-672.
163. Duncan P.I., Stojdl D.F., Marius R.M., and Bell J.C., In Vivo Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing by the Clk1 Protein Kinase, *Mol. Cell. Biol.*, 17 (1997) 5996-6001.
164. Prasad J., Colwill K., Pawson T., and Manley J.L., The Protein Kinase Clk/Sty Directly Modulates SR Protein Activity: Both Hyper- and Hypophosphorylation Inhibit Splicing, *Mol. Cell. Biol.*, 19 (1999) 6991-7000.
165. Berendt F., Expression von CLK2 und htra2 β in *post mortem* Gewebe: Vergleich der Expression zwischen Alzheimer-Patienten, Schizophrenen und Kontrollen, 2002.

166. Brenner C.A., Tam A.W., Nelson P.A., Engleman E.G., Suzuki N., Fry K.E., and Larrick J.W., Message amplification phenotyping (MAPPING): a technique to simultaneously measure multiple mRNAs from small numbers of cells, *Biotechniques*, 7 (1989) 1096-1103.
167. Mullis K. and Faloona F., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction, *Meth Enzymol*, 55 (1987) 335-350.
168. Saiki R.K., Gefland D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., and Ehrlich H.A., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase, *Science*, 239 (1988) 487-491.
169. Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., and Mattick J.S., Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification, *Nucleic Acids Res*, 19 (1991) 4008.
170. Spillantini M.G., Bird T.D., and Ghetti B., Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies, *Brain Pathol*, 8 (1998) 387-402.
171. Hartmann A.M., Rujescu D., Giannakouros T., Nikolakaki E., Goedert M., Mandelkow E.M., Gao Q.S., Andreadis A., and Stamm S., Regulation of alternative splicing of human exon 10 by phosphorylation of splicing factors, *Mol Cell Neurosci*, 18 (2001) 80-90.
172. Hardy J., and Higgins G.A., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science*, 256 (1992) 184-185.
173. Taylor J.P., Hardy J., and Fischbeck K.H., Toxic proteins in neurodegenerative disease, *Science*, 296 (2002) 1991-1995.
174. Walter J., Kaether C., Steiner H., and Haass C., The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases, *Curr Opin Neurobiol*, 11 (2001) 585-90.
175. Smith M.A., Sayre L.M., Monnier V.M., and Perry G., Radical AGEing in Alzheimer's disease, *Trends Neurosci*, 18 (1995) 172-176.
176. Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E.K., Jones P.K., Ghanbari H., Wataya T., Shimohama S., Chiba S., Atwood C.S., Petersen R.B., and Smith M.A., Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 60 (2001) 759-767.
177. Nunomura A., Perry G., Pappolla M.A., Friedland R.P., Hirai K., Chiba S., and Smith M.A., Neuronal oxidative stress precedes amyloid-beta deposition in Down syndrome, *J Neuropathol Exp Neurol*, 59 (2000) 1011-1017.
178. Pratico D., Uryu K., Leight S., Trojanowski J.Q., and Lee V.M., Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis, *J Neurosci*, 21 (2001) 4183-4187.
179. Perry G. and Smith M.A., Is oxidative damage central to the pathogenesis of Alzheimer disease?, *Acta Neurol Belg*, 98 (1998) 175-179.
180. Barghorn S. and Mandelkow E., Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments, *Biochemistry*, 41 (2002) 14885-14896.
181. Clark L.N., Poorkaj P., Wszolek Z., Geschwind D.H., Nasreddine Z.S., Miller B., Li D., Payami H., Awert F., Markopoulou K., Andreadis A., D'Souza I., Lee V.M., Reed L., Trojanowski J.Q., Zhukareva V., Bird T., S.G., and Wilhelmsen K.C., Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (2004) 13103-13107.
182. Rizzu P., van Swieten J.C., Joosse M., Hasegawa M., Stevens M., Tibben A., Niermeijer M.F., Hillebrand M., Ravid R., Oostra B.A., Goedert M., van Duijn C.M., and Heutink P. High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands, *Am J Hum Genet*, 64 (1999) 414-421.

183. Varshavsky A., The N-end rule: functions, mysteries, uses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 12142-12149.
184. Harford J.B. and Morris D.R., Post-transcriptional gene regulation 1997.
185. Glickman M.H. and Ciechanover A., The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev*, 82 (2002) 373-428.
186. Mori H., Kondo J., and Ihara Y., Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease, *Science*, 235 (1987) 1641-1644.
187. Shimura H., Schwartz D., Gygi S.P., and Kosik K.S., CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival, *J Biol Chem*, 279 (2004) 4869-4876.
188. Petrucelli L., Dickson D., Kehoe K., Taylor J., Snyder H., Grover A., De Lucia M., McGowan E., Lewis J., Prihar G., Kim J., Dillmann W.H., Browne S.E., Hall A., Voellmy R., Tsuboi Y., Dawson T.M., Wolozin B., Hardy J., and Hutton M., CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation, *Human Molecular Genetics*, 13 (2004) 703-714.
189. Jiang Z., Tang H., Havlioglu N., Zhang X., Stamm S., Yan R., and Wu J.Y., Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2beta, *J Biol Chem*, 278 (2003) 18997-19007.
190. Daoud R., Da Penha Berzaghi M., Siedler F., Hubener M., and Stamm S., Activity-dependent regulation of alternative splicing patterns in the rat brain, *Eur J Neurosci*, 11 (1999) 788-802.
191. Daoud R., Mies G., Smialowska A., Oláh L., Hossmann K.-A., and Stamm S., Ischemia induces a translocation of the splicing factor tra2- β 1 and changes alternative splicing pattern in the brain, *J Neurosci*, 22 (2002) 5889-5899.
192. Duncan P.I., Stojdl D.F., Marius R.M., Scheit K.H., and Bell J.C., The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing, *Exp Cell Res*, 241 (1998) 300-308.
193. Misteli T.J., Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function, *Cell Sci*, 113 (2000) 1841-1849.
194. Misteli T., Caceres J.F., Clement J.Q., Krainer A.R., Wilkinson W.F., and Spector D.L., Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo, *J Cell Biol*, 143 (1998) 297-307.
195. Butterfield D.A., Boyd-Kimball D., and Castegna A., Proteomics in Alzheimer's disease: insights into potential mechanisms of neurodegeneration, *J Neurol Neurochir Psychiatr*, 86 (2003) 1313-1327.
196. Engidawork E., Gulesserian T., Yoo B.C., Cairns N., and Lubec G, Alteration of capases and apoptosis-related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease, *Biochem Biophys*, 281 (2001) 84-93.
197. Citron M., Secretases as target for the treatment of Alzheimer's disease, *Mol Med Today*, 6 (2000) 392-397.
198. Heppner F.L., Gandy S., and McLaurin J., Current concepts and future prospects for Alzheimer disease vaccines, *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 18 (2004) 38-43.
199. Muraki M., Ohkawara B., Hosoya T., Onogi H., Koizumi J., Koizumi T., Sumi K., Yomoda J., Murray M.V., Kimura H., Furuichi K., Shibuya H., Krainer A.R., Suzuki M., and Hagiwara M., Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks, *J Biol Chem*, 279 (2004) 24246-24256.
200. Zhang M.L., Lorson C.L., Androphy E.J., and Zhou J., An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA, *Gene Ther*, 8 (2004) 1532-1538.

201. Stoss O., Novoyatleva T., Gencheva M., Olbrich M., Benderska N., and Stamm S. p59fyn mediated phosphorylation regulates the activity of the tissue-specific splicing factor rSLM-1, *Mol Cell Neurosci*, 2004.
202. Yasojima K., McGeer E.G., and McGeer P.L., Tangled areas of Alzheimer brain have upregulated levels of exon 10 containing tau mRNA, *Brain Res.*, 831 (1999) 301-305.
203. Brichta L., Hofmann Y., Hahnen E., Siebzehrubl F.A., Raschke H., Blumcke I. Yupoglu I.Y., and Wirth B., Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy, *Human Molecular Genetics*, 12 (2003) 2481-2489.
204. Hofmann Y., Lorson C.L., Stamm S., Androphy E.J., and Wirth B., Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2000) 9618-9623.
205. Cartegni L. and Krainer A.R., Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1, *Nat Genet*, 30 (2002).
206. Lorson C.L., Hahnen E., Androphy E.J., and Wirth B., A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (1999) 6307-6311.
207. Kashima T. and Manley J.L., A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy, *Nat Genet*, 34 (2004) 460-463.
208. Lorson C.L., Strasswimmer J., Yao J.M., Baleja J.D., Hahnen E., Wirth B., Le T., Burghes A.H., and Androphy E.J., SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity, *Nat Genet*, 19 (2004) 63-66.
209. Chang J.G., Hsieh-Li H.M., Jong Y.J., Wang N.M., Tsai C.H., and Li H., Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (2001) 9808-9813.
210. Sumner C.J., Huynh T.N., Markowitz J.A., Perhac J.S., Hill B., Coovert D.D., Schussler K., Chen X., Jarecki J., Burghes A.H., Taylor J.P., and Fischbeck K.H., Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells, *Ann Neurol*, 54 (2003) 647-654.
211. Andreassi C., Jarecki J., Zhou J., Coovert D.D., Monani U.R., Chen X., Whitney M., Pollok B., Zhang M., Androphy E., and Burghes A.H., Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients, *Human Molecular Genetics*, 10 (2001) 2841-2491.
212. Hernandez F., Perez M.Lucas J.J., Mata A.M., and Bhat R.,A.J., Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease, *J Biol Chem*, 279 (2004) 3801-3806.
213. Manabe T., Katayama T., Sato N., Gomi F., Hitomi J., Yanagita T., Kudo T., Honda A., Mori Y., Matsuzaki S., Imaizumi K., Mayeda A., and Tohyama M., Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease, *Cell Death Differ*, 10 (2003) 698-708.
214. Sazani P. and Kole R., Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing, *J Clin Invest*, 112 (2003) 481-486.
215. Miller V.M., Gouvion C.M., Davidson B.L., and Paulson H.L., Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles, *Nucleic Acids Res*, 32 (2004) 661-668.
216. Ding H., Schwarz D.S., Keene A., Affar el B., Fenton L., Xia X., Shi Y., Zamore P.D., and Xu Z., Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis, *Aging Cell*, 2 (2003) 209-217.

217. Gonzalez-Alegre P., Miller V.M., Davidson B.L., and Paulson H.L., Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA, *Ann Neurol*, 53 (2003) 781-787.
218. Miller V.M., Xia H., Marrs G.L., Gouvion C.M., Lee G., Davidson B.L., and Paulson H.L., Allele-specific silencing of dominant disease genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (2003) 7195-7200.
219. Lacerra G., Sierakowska H., Carestia C., Fucharoen S., Summerton J., Weller D, and Kole R., Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97 (2000) 9591-9596.
220. Kalbfuss B., Mabon S.A., and Misteli T., Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, *J Biol Chem*, 276 (2001) 42986-42993.

5 Publikationen

“The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins clk2 and tra2-beta1 is changed in sporadic Alzheimer’s disease” (in Vorbereitung)

Postervorträge

1. Glatz D., Hartmann A.M., Riederer P., Rujescu D. (2000) Altered expression of tau exon 10 in post mortem brain of patients with Alzheimer’s disease. Research Festival, Ludwigs-Maximilians-Universität, München
2. Glatz D., Berendt F., Hartmann A.M., Faltraco F., Hampel H., Riederer P., Rujescu D. (2001) Altered expression of tau exon 10, clk2 and htra2- β in post mortem brain of patients with Alzheimer’s disease. Research Festival, Ludwigs-Maximilians-Universität, München
3. Glatz D., Berendt F., Hartmann A.M., Faltraco F., Hampel H., Riederer P., Rujescu D. (2002) Altered expression of tau exon 10, clk2 and htra2- β in post mortem brain of patients with Alzheimer’s disease. Research Festival, Ludwigs-Maximilians-Universität, München
4. Glatz D., Berendt F., Faltraco F., Hartmann A.M., Hampel H., Riederer P., Möller H.-J., Rujescu D. (2003) Altered expression of tau exon 10, clk2 and htra2- β in post mortem brain of patients with Alzheimer’s disease. Research Festival, Ludwigs-Maximilians-Universität, München

6 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dan Rujescu für die Überlassung des interessanten Themas, seine Betreuung und dem Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Prof. H.-J. Möller meinen Dank für die Betreuung meiner Arbeit aussprechen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Prof. Stefan Stamm, der es mir ermöglichte, einen Teil meiner Arbeit in seinem Labor in Erlangen durchzuführen. Für seine konstruktiven Vorschläge und Ideen war ich immer sehr dankbar.

Ebenfalls möchte ich mich bei PD Harald Hampel, Prof. Peter Riederer und Dr. Frank Faltrako bedanken, die mir die Gehirne für meine Arbeit zur Verfügung stellten.

Ein ganz spezieller Dank geht an Annette Hartmann, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und deren Freundschaft ich nicht missen möchte.

Aufgrund des außerordentlich netten Teams hat mir die Arbeit im Labor sehr viel Spaß bereitet. Auf diesem Wege möchte ich mich noch einmal ganz herzlich bei Annette Hartmann, Chris Murgatroyd, Frank Berendt, Toni Gietl, Hanna Räder, Claudia Gonnermann und Sven Vopel für ihre stete Unterstützung danken. Auch für die freundliche Hilfe von Just Genius und Jörg Wiesner am Ende meiner Arbeit war ich sehr dankbar.

Vielen Dank an Ina Giegling und Nikolaus Kleindienst, die mir bei allen Problemen meiner statistischen Auswertung immer hilfreich beiseite standen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Steffi Werner bedanken, ohne deren Überzeugungskraft und Ermutigung ich diesen Weg überhaupt nicht eingeschlagen hätte.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie, die mir durch ihre Unterstützung die Promotion ermöglichte. Eine besondere Hilfe war mir immer meine Mutter sowie meine Schwester Claudia.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Ina und Peter Arendt und den Rest des Teams der Forellen-Apotheke, die mich im letzten Jahr durch ihr Verständnis, ihre Hilfsbereitschaft und Interesse an Fortgang meiner Doktorarbeit stets unterstützten.

Das letzte, dafür aber ein ganz besonderes Dankeschön geht an Chris Murgatroyd, der mir nicht nur bei vielen fachlichen Problemen, sondern auch in vielen anderen Situationen immer hilfreich beiseite stand.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Christa Glatz
Geburtsdatum: 19.07.1969
Geburtsort: Nürnberg

Schulbildung

1975 – 1980 Grundschule Lohfelden
1980 – 1989 Engelsburg-Gymnasium, Kassel
17. Mai 1989 Abitur

Studium und berufliche Tätigkeit

1989 – 1990 Biologiestudium an der
Bayer. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
1990 – 1992 Ausbildung an der PTA-Schule, Kassel
1992 – 1993 PTA-Praktikum in der Kurhessischen Apotheke, Kassel
11. März 1993 Abschlussprüfung
05/93 – 10/93 Tätigkeit als PTA in der Post-Apotheke, Kassel
1993 – 1998 Pharmaziestudium an der Philipps-Universität, Marburg
05/98 – 10/98 Pharmaziepraktikum in der Europa-Apotheke, Kassel
11/98 – 04/99 Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Klinikums der
Justus-Liebig-Universität, Gießen
11. Mai 1999 3. Staatsexamen
1999 Tätigkeit als Apothekerin in der Partnach-Apotheke, München

Promotion

2000 – 20004 Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität, München,
Arbeitsgruppe Dr. Dan Rujescu
Thema: Alternatives Fehlspleißen von Tau Exon 10, Clk2 und Htra2- β
in *post mortem* Gehirnen von Alzheimer-Patienten

München, den 29.06.04

Daniela Glatz